



## PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/147715>

Please be advised that this information was generated on 2018-07-07 and may be subject to change.

1731

interaktie  
tussen  
lymfocyt,  
makrofaag  
en poliovirus

f.j.c.j. soontiëns



# **INTERAKTIE TUSSEN LYMFOCYT, MAKROFAAG EN POLIOVIRUS**

**Een onderzoek naar het mechanisme van de door poliovirus  
geïnduceerde remming der DNA-synthese van de met  
phytohemagglutinine gestimuleerde, humane  
perifere lymfocyt.**

## **INTERACTION BETWEEN THE LYMPHOCYTE, THE MACROPHAGE AND POLIOVIRUS**

**An investigation into the mechanism of the poliovirus induced-inhibition of the  
DNA-synthesis of the phytohaemagglutinin-stimulated, human  
peripheral lymphocyte.**

**With a Summary in English.**

PROMOTORES

Prof. Dr. J. van der Veen

Prof. Dr. Ch. M. A. Kuyper

# INTERAKTIE TUSSEN LYMFOCYT, MAKROFAAG EN POLIOVIRUS

Een onderzoek naar het mechanisme van de door poliovirus geïnduceerde remming der DNA-synthese van de met phytohemagglutinine gestimuleerde, humane, perifere lymfocyt.

## PROEFSCHRIFT

Ter verkrijging van de graad van doctor  
in de wiskunde en natuurwetenschappen  
aan de Katholieke Universiteit te Nijmegen  
op gezag van de rector magnificus  
Prof. Mr. F. J. F. M. Duynstee  
volgens het besluit van het college van decanen  
in het openbaar te verdedigen op:  
vrijdag 19 januari 1973, des namiddags te 2 uur precies

## DOOR

Franciscus, Johannes, Carolus Jozephus Soontjens

Geboren te Breda

Nijmegen, 1972.



**aan mijn Ouders**

**voor Paulien, Martijn en Bastiaan**



Dit onderzoek werd uitgevoerd in het Instituut voor Medische  
Microbiologie (Hoofd: Prof. Dr. J. van der Veen) in samen-  
werking met Connie Volaart en Annelies Dekkers.

Het manuscript werd getypt door José Kersten.

Cees Nicolassen verzorgde de illustraties en omslag.

De offsetdruk werd uitgevoerd door Rein Tissen en Hennie Giesbers.

## Inhoud

Lijst van afkortingen	11
Inleiding	13
Hoofdstuk 1. Literatuuroverzicht	15
Hoofdstuk 2. Materiaal en Methoden	23
2.1. Celkweken en Media	23
2.2. Virusstammen	23
2.3. Bereiding der kweken van perifere leukocyten	24
2.3.1. Kweken van ongezuiverde lymfocyten	24
2.3.2. Kweken van gezuiverde monoccyten	24
2.3.3. Kweken van gezuiverde lymfocyten	25
2.3.4. Kweken van polymorfkernige leukocyten	25
2.3.5. Beënting der kweken met virus	25
2.4. Bereiding der kweken van tonsillaire lymfocyten	26
2.5. Bepaling celmorphologie en differentiële samenstelling	26
2.6. Bepaling der DNA- en RNA-synthese	27
2.6.1. Bepaling der DNA-synthese	27
2.6.2. Bepaling der RNA-synthese	28
2.7. Virustitraties	28
2.7.1. Bepaling totale hoeveelheid virus in de kweken	28
2.7.2. Bepaling percentage geïnfecteerde cellen	29
2.8. Virusinaktivering	29
2.9. Bepaling van antistoftiters	29
2.10. Bepaling van interferon	29
Hoofdstuk 3. Onderzoek naar de cultuurkondities voor een optimale PHA-respons en reproduceerbaarheid der methoden	31
3.1. Inleiding	31
3.2. Bereiding der leukocyten-suspensies	31
3.3. "Normale" PHA-respons en factoren welke daarop van invloed zijn	35
3.3.1. Cultuurkondities	35
3.3.2. Kinetiek der PHA-respons	36
3.3.3. Biologische variabiliteit van de PHA-respons	40
3.3.4. Invloed der kolomzuivering op de PHA-respons	40
3.3.5. Conclusies en Commentaar	43

3.4	Reproduceerbaarheid van de bepaling der DNA-synthese	44
3 4 1	Inleiding	44
3 4.2.	Analyse der spreidingsoorzaken	44
3 4.3.	Telrendement	44
3 5.	Reproduceerbaarheid van de plaquetechniek	46
Hoofdstuk 4. Onderzoek naar de door poliovirus geïnduceerde remming der DNA-synthese		48
4 1	Inleiding	48
4 2	Resultaten	48
4.2.1.	Remming in kweken van ongezuiverde lymfocyten	48
4.2.2	Remming in kweken van gezuiverde lymfocyten	50
4.3	Konklusies	50
4 4	Analyse van de factoren welke de remming beïnvloeden	52
4 4 1	Invloed der cultuurkondities	52
4.4 2	Invloed van de mate van virulentie van poliovirus	54
4 4 3	Invloed van inaktivering van poliovirus	54
4 4 4.	Invloed van poliovirus op de vitaliteit der kweken	56
4 4.5.	Analyse van mogelijke korrelaties	56
4 4.6	Invloed van poliovirus op niet gestimuleerde kweken	56
4 4 7	Invloed van tijdstip der virusenting	56
4 4 8	Invloed van de Multiplicity of Infection	58
4.4.9.	Invloed van guanidine	58
4.5	Interactie tussen lymfocyten en monoccyten (makrofagen)	58
4 6	Konklusies	61
Hoofdstuk 5. Onderzoek naar de vermenigvuldiging van poliovirus in lymfocyten en monoccyten		62
5.1.	Inleiding	62
5 2	Resultaten	62
5 2 1	Vermenigvuldiging in kweken van ongezuiverde lymfocyten	62
5 2 2.	Invloed van concentratie en tijdstip van toevoeging van PHA	64
5 2 3.	Invloed der cultuurkondities	66
5 2 4.	Invloed van de celconcentratie	66
5 2.5.	Invloed van de Multiplicity of Infection ( $\geq 1$ PFU/cel)	66
5 2 6.	Invloed van de Multiplicity of Infection ( $< 1$ PFU/cel)	68

5 2. 7. Vermenigvuldiging in kweken van gezuiverde lymfocyten	68
5.2. 8. Celtype verantwoordelijk voor de virusvermenigvuldiging	70
5.2. 9. Vermenigvuldiging in kweken van gezuiverde monocysten	71
5.2. 10. Invloed van de mate van virulentie van poliovirus	71
5.2. 11. Ontwikkeling der virusgevoeligheid van de kweken	73
5 3. Konklusies	75
 Hoofdstuk 6    Diskussie	 77
 Samenvatting	 87
 Summary	 89
 Literatuurreferenties	 91



# Lijst van afkortingen.

Ab-titer	Antilichaamtiter
BSS	Basal Salt Solution
C <sub>i</sub>	Curie
CPE	Cytopathologisch Effect
cpm	Count per minute
d <sub>x</sub>	Dag x
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
EDTA	Ethyleendiaminetetraazijnzuur
fKAS	Foetaal Kalfs serum
<sup>3</sup> H-TdR	Getitiseerd Thymidine
<sup>3</sup> H-UR	Getitiseerd Uridine
KAS	Kalfs serum
LAH	Lactalbumine Hydrolysaat
MEM	Minimal Essential Medium
mmol	Milligrammolekuul
MOI	Multiplicity of Infection
n	Aantal experimenten
nKAS	Nuchter kalfs serum
α-NPO	α-Naftyl fenyloxazol
ns	Niet significant
PAN	Primaire Apenier
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFU	Plaque-Forming-Units
PHA	Phytohemagglutinine
PMN	Polymorfkernige leukocyt
PPO	2.5-difenyloxazol
RNA	Ribonucleïnezuur
rpm	Revolutions per minute
S.A.:	Standaardafwijking, $\sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$
S.D.	Standard Deviation
TCA	Trichloorazijnzuur
t	t-waarde volgens Student, voor gepaarde waarneming $t = \frac{\bar{x}}{S.A.} \sqrt{n}$
UV	Ultraviolet
V <sub>x</sub>	Virulentie op dag x
v.c.	Variatiecoëfficiënt $\frac{S.A.}{\bar{x}} \cdot 100\%$
w/v	Weight/volume gram/ 100 ml
v/v	Volume/volume ml/ 100 ml
$\bar{x}$	Gemiddelde $\frac{\sum x}{n}$



Uit onderzoekingen van de laatste jaren blijkt dat de leukocyten, en wel voornamelijk de lymfocyt en de monocyt-makrofaag, een belangrijke rol spelen in het verloop van virusinfekties.

Ten gevolge van de interactie van virussen met lymfocyten zou de functie van de lymfocyt bij de immunologische afweer kunnen worden onderdrukt. Zo is bijvoorbeeld na polio vaccinatie de vertraagde overgevoeligheidsreactie op tuberkuline verminderd (Berkovitch et al., 1966).

Phytohemagglutinine (PHA), een extract uit de zaden van *Phaseolus vulgaris*, veroorzaakt in vitro de transformatie van de lymfocyt tot lymfoblast. Deze zogenaamde blastogenese gaat gepaard met een stimulatie van de RNA- en eiwitsynthese, gevolgd door een inductie der DNA-synthese en mitotische activiteit.

Poliovirus remt zowel de door PHA geïnduceerde, als de door specifiek anti-geen geïnduceerde DNA-synthese van de lymfocyt (Willems et al., 1969c, 1970).

Het doel van ons onderzoek was, opheldering te verkrijgen omtrent het mechanisme waardoor poliovirus de DNA-synthese van met phytohemagglutinine gestimuleerde lymfocyten remt. De vermindering van de DNA-synthese kon niet worden toegeschreven aan een cytopathogeen effect van het virus (Willems et al., 1969c).

In tegenstelling tot de bevindingen van Willems et al. (1969b) vonden wij dat de door PHA geïnduceerde lymfoblast geen rol van betekenis speelt in de vermenigvuldiging van poliovirus in lymfocytenkweken. De veronderstelling dat een "abortieve" infectie van de lymfocyt door poliovirus de oorzaak zou zijn van de remming der DNA-synthese (Willems et al., 1969c), werd door ons onderzoek niet bevestigd.

Een direct effect van poliovirus op de DNA-synthese van de cel lijkt niet verantwoordelijk te zijn voor de door poliovirus geïnduceerde remming der DNA-synthese van de met PHA gestimuleerde lymfocyt.

Ter verklaring van de remming der DNA-synthese van de gestimuleerde lymfocyt door poliovirus postuleerden wij de hypothese dat deze remming indirect werd veroorzaakt door een effect van poliovirus op de monocyt-makrofaag, waardoor de noodzakelijke rol van dit celtype tijdens de stimulatie van de lymfocyt door PHA wordt geblokkeerd. Deze hypothese houdt rekening met de, ook door anderen gevonden, waarneming, dat intacte makrofagen noodzakelijk zijn voor zowel de specifieke antigeen- als voor de PHA-stimulatie van de lymfocyt.

De resultaten van ons onderzoek zijn met de voorgestelde hypothese in overeenstemming: de monocyt-makrofaag is noodzakelijk voor de remming der DNA-synthese en bovendien verantwoordelijk voor de virusreplikatie in de lymfocytenkweken.

\* Voor literatuurreferenties verwijzen wij naar hoofdstuk 1.





Sinds de publikaties van Metchnikoff, Maximov en anderen rond de eeuwwisseling over de fagocyterende aktiviteit van leukocyten, is er veel onderzoek gedaan naar de rol van de verschillende typen van deze cellen -lymfocyten, polymorfkernige leukocyten en monocyten- in de afweerreactie van het organisme tegen bacteriële infecties. De anti-bacteriële immuniteit wordt tegenwoordig relatief goed begrepen (overzicht Mackaness en Blanden, 1967).

De rol van de verschillende typen leukocyten in virale infecties is echter veel minder duidelijk. Het feit dat natuurlijke en experimentele virusinfecties vaak gepaard gaan met veranderingen in de leukocyten samenstelling en het optreden van atypische leukocyten, suggereert een rol van deze cellen in de viruspathogenese. Deze veronderstelling wordt ondersteund door onderzoekingen waarin tijdens natuurlijke of experimentele virusinfecties uit de verschillende typen leukocyten virussen konden worden geïsoleerd. Voor een overzicht van de leukocyt-virus interactie wordt verwezen naar het overzicht van Gresser en Lang (1966). In leukemische en lymfomateuze cellen werd eveneens de aanwezigheid van virusantigenen aangetoond. De kausale relatie is echter nog geenszins duidelijk (overzicht Epstein, 1971c).

Uit tal van onderzoekingen bleek dat de makrofaag een sleutelpositie inneemt in de weerstand van de gastheer tegen virale infecties en van groot belang is voor het verloop van de viruspathogenese (overzichten Mims, 1964, Allison, 1970). In verschillende experimentele diersystemen bleek dat de virusgevoeligheid van de gastheer direct is gekorreleerd met de virusgevoeligheid van de makrofaag (Bang et al., 1960, Goodman et al., 1962, Johnson, 1964, Roberts, 1964, Hirsch et al., 1970).

De makrofaag (overzichten Pearsall en Weiser, 1970, Vernon-Roberts, 1972) of mononucleaire fagocyt (Furth, 1970) is een relatief groot celtype, voorkomend in bijna alle weefsels van het organisme en deel uitmakend van het zogenaamde Reticulo-endotheliale systeem (overzicht Stuart, 1970), dat zorg draagt voor de verwijdering van lichaamsvreemde partikels. Hun endocytotische aktiviteit speelt een belangrijke rol in ontstekingsreacties (overzicht Spector, 1970), de inductie der antilichaamsynthese (overzichten Schwartz et al., 1970, Unanue en Cerottini, 1970) en de cellulaire immuniteit (overzichten Mackaness, 1970, Bloom en Bennett, 1970). De makrofagen zijn in het organisme op strategische plaatsen gelokaliseerd en daardoor in een unieke positie om reeds in een vroeg stadium van een virusbesmetting met viruspartikels in contact te komen. Het verloop van een virusinfectie hangt dikwijls af van deze, vroege, makrofaag-virus interactie (overzicht Mims, 1964).

Er zijn sterke aanwijzingen dat de monocyt de direkte voorloper is van de makrofaag (Furth et al., 1968). Uit de onderzoeken van Cohn en medewerkers werd duidelijk dat de monocyt zich in vitro kan ontwikkelen tot een makrofaag, een transformatieproces dat gepaard gaat met vele morfologische, metabolische en functionele veranderingen, zoals een toename van het celvolume, van het Golgi-komplex, van het aantal lysosomen en mitochondriën, van de activiteit der lysosomale enzymen, van de glycolytische activiteit, van de RNA- en eiwitsynthese en van de fagocytotische activiteit (overzicht: Cohn, 1969).

Of de monocyt de enige voorloper-cel is voor het ontstaan van de makrofaag is nog een omstreden kwestie. Uit de onderzoeken van Elves en medewerkers werd waarschijnlijk dat ook de lymfocyt zich, onder invloed van polymorfkernige leukocyten, kan transformeren tot een makrofaag (Gough et al., 1965; Elves et al., 1966). Deze laatste onderzoeken hebben de inzichten omtrent het pluripotente karakter van de lymfocyt aanzienlijk gewijzigd. Tegenwoordig wordt algemeen aanvaard dat de lymfocyt geen inerte eindcel is, maar een celtype met vele differentiatiemogelijkheden en functies (overzicht: Elves, 1966b).

De belangrijkste functie van de lymfocyt is haar immunologische competentie (overzicht: Gowans en MacGregor, 1965). Klinische en experimentele gegevens zijn consistent met de opvatting van een uit twee componenten bestaand lymfoïd systeem (overzicht: Craddock et al., 1971):

- a) de zogenaamde "Thymus-dependent" of T-lymfocyten, op de allereerste plaats verantwoordelijk voor de cellulaire immuniteit, waarin als effectoren specifiek gesensibiliseerde lymfocyten optreden, en
- b) de zogenaamde "Bursa-equivalent-dependent" of B-lymfocyten, verantwoordelijk voor de humorale immuniteit, waarin specifieke immunoglobulinen de effectoren zijn.

Hoewel de functies van beide typen van lymfocyten te onderscheiden zijn, bestaat er een grote mate van wisselwerking tussen beide (overzicht: Miller et al., 1971). Met name kunnen de T-cellen als helpercellen optreden tijdens de inductie van de antilichaam-synthese (overzicht: Mitchell et al., 1971).

In het inductieproces van zowel de humoraal-als de cellulair-immunologische reactie tegen pathogene antigenen (zoals bacteriën en virussen) speelt de makrofaag een primaire rol door de fagocytose en modificatie van het antigeen en ook in de afwikkeling van de immuunreactie zijn zij onmisbaar (overzichten: Nelson, 1969; Schwartz et al., 1970; Mackaness, 1970).

Uit onderzoeken van de laatste jaren blijkt dat het vooral de cellulaire immuniteit is, die een rol speelt in de afweer van de gastheer tegen virale infecties (overzicht: Glasgow, 1970a). Bij patiënten met een dysfunctie van de humorale immuunreactie verloopt een virusinfectie gewoonlijk normaal, doch patiënten met syndromen waarbij de cellulaire immuniteit is gestoord, vertonen een ver-

hoogde gevoeligheid voor bepaalde virusinfekties (Fulginiti et al., 1968). Uit experimenten waarin de invloed van thymektomie, bestraling, immunosuppressiva en anti-lymfocytenserum werd nagegaan, kon eveneens de centrale functie van de cellulaire immuniteit in de afweer tegen virusinfekties worden afgeleid (Zisman et al., 1970) (overzichten Hirsch en Murphy, 1968; Glasgow, 1970a). Ook de door virus geïnduceerde synthese van interferon, een anti-viraal eiwit waarvan het werkingsmechanisme nog een omstreden vraag is (overzicht Clercq en Merigan, 1970) lijkt een functie van de cellulaire immuunreactie te zijn en wellicht een belangrijke faktor in het verloop van de viruspathogenese (overzichten Glasgow, 1970b, Baron, 1970).

Terwijl de cellulaire immuniteit enerzijds belangrijk is in het onschadelijk maken van een virusinfektie, kan de afweerreactie anderzijds juist de ziekteverschijnselen oproepen, die karakteristiek zijn voor de betreffende virusinfektie (overzicht Allison, 1967).

Er blijkt in de gastheer een subtiel evenwicht te bestaan tussen de activiteit van het virus en de immunologische reactie erop. Afhankelijk van het soort virus en plaats van infectie kan de immunologische reactie een rol in de afweer van de virusinfektie en in de viruspathogenese spelen (overzichten Allison, 1967, Glasgow, 1970a).

Verschillende virussen kunnen het normaal functioneren van het immunologische mechanisme aanzienlijk verstoren, hetgeen de oorzaak is van allerlei immunopathologische afwijkingen (overzicht Notkins et al., 1970). Ze kunnen de verschillende uitingen van de immunologische functie zoals de antilichaamsynthese, vertraagde overgevoelighedsreactie, transplantaat- en tumorafstoting en fagocytose zowel onderdrukken als juist stimuleren.

In dit verband zijn de zogenaamde persisterende virusinfekties (zoals bijvoorbeeld rubella-en LCM-virus) interessant, waarin het virus op een nog grotendeels onopgehelderde wijze de immunologische afweer van de gastheer ontloopt of trotseert en gedurende lange tijd in de gastheer aanwezig is (overzichten Volkert en Hannover-Larsen, 1965, Rawls, 1968, Gard et al., 1969). Volgens Rawls (1968) zou het virus in deze gevallen een specifieke tolerantie van de cellulaire immuniteit induceren, veroorzaakt door de mogelijke aanwezigheid van het virus in immunokompetente cellen.

Op basis van deze gegevens moeten virussen beschouwd worden als mogelijke oorzaak van allerlei syndromen met onbekende etiologie waarin de immunologische functie is verstoord.

Het effect van een virusinfektie op het immunologische mechanisme is mogelijk een faktor in de tumorgenese (Friedman et al., 1971), en de etiologie van autoimmuunziekten (Allison et al., 1971).

Uit voorgaand, kort, overzicht wordt het belang van het onderzoek van de lymfocyt-makrofaag-virus interactie genoegzaam duidelijk.

Reeds lang wordt gepoogd de functie en het werkingsmechanisme van het immunologisch apparaat te bestuderen onder gecontroleerde in vitro omstandigheden (overzicht Dutton, 1967). Thans zijn tal van in vitro modellen beschikbaar, zowel voor de humorale (overzicht Coombs en Franks, 1969) als voor de cellulaire immuunreactie (overzicht Bloom, 1971).

Een veel bestudeerd model van de cellulaire immuunreactie is de specifieke antigeen-stimulatie, een in vitro analogon van de vertraagde overgevoelighedsreactie, waarin de gesensibiliseerde lymfocyt van een gefimmuniseerde donor, onder invloed van het specifieke antigeen, wordt gestimuleerd en zich transformeert tot een lymfoblast: een grote, basofiele en zich actief delende cel (Pearmain et al., 1963, Elves et al., 1963).

Naast de specifieke stimuli onderscheidt men de zogenaamde aspecifieke stimuli of mitogenen, zoals bijvoorbeeld phytohemagglutinine. Phytohemagglutinine (PHA), een extract uit de zaden van *Phaseolus vulgaris*, werd reeds door Landsteiner gebruikt om erythrocyten te agglutineren en Li en Osgood (1949) gebruikten het om suspensies van leukocyten te scheiden van erythrocyten.

De blastogene en mitogene eigenschappen van PHA werden ontdekt door Nowell (1960), die aantoonde dat de lymfoblasten in leukocytenkweken, welke waren bereid in aanwezigheid van PHA, door PHA werden geïnduceerd. In 1962 toonde Carstairs aan dat de kleine lymfocyt de directe voorloper is van de door PHA geïnduceerde lymfoblast.

De kleine lymfocyt, gekenmerkt door een grote nucleus, zonder nucleoli, en een smalle ring van cytoplasma, transformeert zich onder invloed van PHA tot een twee tot vier maal grotere lymfoblast met een sterk basofiel cytoplasma en een grote leptochromatische kern met een of meer nucleoli (Yoffey et al., 1965). Deze cellen zijn in staat zich te delen, in tegenstelling tot de lymfocyt (Cooper et al., 1965).

Elektronenmikroskopische onderzoeken toonden een grote toename aan van het Golgi-apparaat en van het aantal ribosomen en mitochondrien (Elves et al., 1964). De morfologische veranderingen gaan gepaard met een stimulatie der metabolische activiteit. Zowel RNA-synthese (Rubin et al., 1965, Cooper et al., 1965, Rubin, 1970a; Cooper, 1970a) als eiwitsynthese (Torelli et al., 1966, Parenti et al., 1966, Kay et al., 1971) worden gestimuleerd, waarna de DNA-synthese wordt geïnduceerd (Bender en Prescott, 1962, Cooper et al., 1963, Michalowski, 1966, Salzman et al., 1966).

Eveneens is een toename van de glykolytische activiteit te konstaten (Rabinowitz et al., 1967, 1968) en is de activiteit van allerlei enzymen verhoogd. Voor een uitgebreid overzicht van alle biochemische en metabolische veranderingen tijdens de blastogenese verwijzen wij naar de overzichten van Naspitz en Richter (1968) en Ling (1968).

Het mechanisme der PHA stimulatie is nog geenszins duidelijk. Aangetoond werd dat de PHA stimulatie gepaard gaat met veranderingen op alle niveaus van genetische controle, zoals transkriptie, transport en translatie van de genetische informatie (overzicht Cooper, 1970b). De PHA stimulatie van de lymfocyt wordt dan ook frekwent gebruikt als model voor de bestudering van de gen-aktivering en gen-expressie.

Over de vraag of PHA de gen-aktivering tot stand brengt, indirect, middels een, extracellulaire, membraanaktivering via PHA specifieke receptoren op het oppervlak van de lymfocyt (Lindahl-Kiessling, 1972) of door een direct, intracellulair effect (Adler et al., 1972) zijn de meningen nog verdeeld.

Onmiddellijk na PHA toevoeging worden een aantal membraan-gebonden enzy-men, zoals het Na-K-ATP-ase (Quastel et al., 1970) en het adenylcyclase (Pastan et al., 1971) geaktiveerd en treden complexe veranderingen op in het desoxyribonucleoproteïne complex, zoals histonacetylatie (Pogo et al., 1966) fosforylatie van de nucleoproteïnen (Kleinsmith et al., 1966) en een toegenomen affiniteit van het DNP-komplex voor acridine-oranje (Killander et al., 1965, 1969) en actinomycine (Darzynkiewicz et al., 1968, 1969).

Als gevolg van de antigene of mitogene stimulatie produceert de lymfoblast in vitro een aantal eiwitten, de zogenaamde lymfokinen, waarvan men het vermoeden heeft, dat zij een belangrijke rol spelen in de cellulaire immuunreactie (overzicht Lawrence en Landy, 1969). Als een van deze lymfokinen wordt interferon beschouwd, dat zowel tijdens de antigeen- (Green et al., 1969) als tijdens de PHA stimulatie (Wheelock, 1965) in het medium van de leukocyten-kweken verschijnt.

De in vitro transformatie van de lymfocyt door PHA, wordt gebruikt als criterium voor het al of niet 'normaal' functioneren van dit celtype (Rubin, 1970b) en de inkorporatie van  $^3\text{H}$ -thymidine in het DNA wordt vaak als parameter van de PHA-respons gehanteerd (Fitzgerald, 1972).

Op basis van het feit dat lymfocyten van patiënten met verschillende lymfoproliferatieve afwijkingen, die gepaard gaan met een gestoorde cellulaire immuniteit, zoals ziekte van Hodgkin, chronische lymfatische leukemie, lymfosarcoma, agammaglobulinemie en thymusdysplasie, zich niet of nauwelijks door PHA laten stimuleren (overzicht Rubin, 1970b), postuleerden Hersh en Oppenheim (1965) de hypothese dat de PHA-reaktiviteit een parameter zou zijn van de cellulair immunologische competentie van de lymfocyt.

Uit experimenten waarin de invloed van thymektomie op de PHA-respons werd onderzocht, werd duidelijk dat het de T-lymfocyten zijn, die zich door PHA laten stimuleren (Janossy et al., 1971).

Lymfocyten van patiënten met congenitale rubella (Montgomery et al., 1967), infectieuze hepatitis (Mella et al., 1967) en infectieuze mononucleosis (Rubin, 1966) vertonen eveneens een verminderde PHA-respons.

Olson et al. (1968) suggereerden dat sommige virussen in staat zouden zijn in lymfocyten te penetreren, te interfereren met het celmetabolisme en daardoor de oorzaak zouden zijn van een gestoorde cellulair immunologische competentie en van een verminderde PHA-reaktiviteit van de lymfocyt. Het bleef echter de vraag of, primair, een gestoorde immunologische reaktiviteit de patiënten gevoeliger maakt voor bepaalde virusinfecties of dat, primair, de virusinfectie de oorzaak is van een gestoorde immunologische reaktiviteit.

Daarom werd in verschillende onderzoeken de invloed van een in vitro virusinfectie op de PHA-respons van normale lymfocyten nagegaan (overzicht: Wheelock, 1971). Vele virussen blijken de PHA-respons van normale lymfocyten te remmen (zoals rubella, mazelen, NDV, VSV, Influenza A en B, bof, Sendai, reo, polio, ECHO, vaccinia, herpes) doch in de meeste gevallen kon dit worden toegeschreven aan de cytopathogene aktiviteit van deze virussen. Slechts voor een aantal virussen (rubella, mazelen, polio en ECHO) vormde dit geen verklaring voor de waargenomen remming der PHA-respons (Olson et al., 1968, Willems et al., 1969a, Zweiman, 1971).

Terwijl de monocyt-makrofaag een relatief virusgevoelig celtype is, waarin een groot aantal virussen zich kunnen vermenigvuldigen (overzicht Silverstein, 1970) vormt de kleine lymfocyt een virusresistente cel. Alleen in lymfoblasten, ontstaan na antigene of mitogene stimulatie van de lymfocyt, of aanwezig in lymfoblastoïde cellijnen van lymfomateuze (Burkitt) of leukemische oorsprong, zijn bepaalde virussen in staat zich te repliceren (Wallace, 1969, Chung et al., 1970, overzicht Wheelock, 1971).

Zo zijn herpes- (Nahmias et al., 1964), bof- (Duc-Nguyen et al., 1966) vaccinia- (Miller et al., 1968) vesicular stomatitis- (Edelman et al., 1968) en gele koortsvirus (Wheelock et al., 1969) in staat zich in lymfocytenkweken te vermenigvuldigen, slechts na stimulatie met PHA.

Verschiedende virussen, zoals VSV, gele koortsvirus en polio kunnen zich in niet gestimuleerde leukocytenkweken vermenigvuldigen omdat zij de monocyt-makrofaag als gastcel gebruiken (Edelman et al., 1967, Willems et al., 1969b, Wheelock et al., 1969).

Edelman en Wheelock (1968) opperden de veronderstelling dat stimulatie van het celmetabolisme van de lymfocyt een voorwaarde zou zijn voor de virusreplikatie. Ter verklaring hiervan dachten zij in eerste instantie aan de toename van het aantal, voor de synthese van virus-specifieke eiwitten noodzakelijke, ribosomen na PHA stimulatie. Willems et al (1969b) meenden dat door een toename van virus-specifieke oppervlaktreceptoren, als gevolg van de transformatie, de virusadsorptie en penetratie efficiënter zouden verlopen.

Terwijl PHA dus enerzijds noodzakelijk blijkt voor het ontstaan van virusgevoelige lymfoblasten, lijkt het ze anderzijds weer partieel resistent te maken door de inductie van de interferonsynthese (Wheelock, 1965, Friedman et al., 1967, Epstein et al., 1970a).

Verschillende virussen, zoals Sendai (Gresser, 1961), en NDV (Wheelock, 1966) zijn eveneens in staat in leukocytenkweken de synthese van interferon te induceren. De door virus-geïnduceerde interferonsynthese zou een van de oorzaken kunnen zijn voor de relatieve virusongevoeligheid van de lymfocyt, naast het ontbreken van voldoende ribosomen en van virusspecifieke receptoren.

Uit het voorgaande, beknopte overzicht wordt wellicht duidelijk dat de leukocyt-virus interactie een gekompliceerd verschijnsel is, waarvan het onderzoek ons inzicht kan verschaffen in het mechanisme van de immunologische afweer van de gastheer tegen virusinfekties als ook in het verloop van de viruspathogenese en bovendien in het ontstaan van virus-geïnduceerde immunodeficiëntieziekten en in het mechanisme van de zogenaamde persisterende virusinfekties.

De remming van de DNA-, de RNA-, en de eiwitsynthese door poliovirus.

Evenals andere picornavirussen, is poliovirus in staat de cellulaire RNA-, eiwit- en DNA-synthese te remmen (overzichten: Franklin en Baltimore, 1962, Holland, 1964, Martin en Kerr, 1968).

Ackermann et al. (1965b) postuleerden de hypothese dat de remming der DNA-synthese tot stand kwam via een stimulatie van de histon-synthese door poliovirus (Ackermann et al., 1965a), waardoor de "primer"-aktiviteit -als ook de "template"-aktiviteit- van het DNA zouden worden geblokkeerd.

Hand et al. (1971) vonden, dat niet het proces der "chain-elongation", doch het initiatieproces van de DNA-replikatie door het virus wordt geremd, wellicht als gevolg van de remming der eiwitsynthese.

Hunt et al. (1971) toonden aan dat deze remming van de eiwitsynthese geschiedt door middel van een virusspecifiek, dubbelstrengig RNA, dat de assemblage van ribosomen tot polysomen zou kunnen verhinderen (Leibowitz et al., 1971). Tijdens de replikatiecyclus van poliovirus, een enkelstrengig RNA-virus, verschijnt een dubbelstrengig RNA ("Replicate From") als tussenstadium (overzicht, Erikson, 1968).





### 2.1. Celkweken en Media

Voor de bereiding der poliovirussuspensies werd gebruik gemaakt van primaire kweken van niercellen die afkomstig waren van rhesusapen. De cellen werden bij 36°C gekweekt in 250 ml-Kimble flessen met Hanks' fysiologisch zout-oplossing (BSS) (Hanks et al., 1949) waarin 0,5% (w/v) lactalbumine hydrolysaat (LAH) (N. B. C.) en 20% kalfsserum als onderhoudsmedium.

Het passagemedium bestond uit TC-medium 199 (Gibco) (Morgan et al., 1950) met 2% nuchter kalfsserum\*.

Voor de infectiviteitstitraties van poliovirus werd gebruik gemaakt van Vero-cellen, een cellijn die afkomstig is van apenieren (Yanamura et al., 1963). Ze werden gekweekt in Hanks BSS met 0,5% (w/v) LAH en 20% kalfsserum in Falcon plastic petrischaaltjes (60 x 15 mm), bij 36°C in een atmosfeer van 5% CO<sub>2</sub> in lucht en 98% relatieve vochtigheid. Na drie dagen was een aaneengesloten monolayer gevormd en werden de schaaltes gebruikt voor de virus-titraties.

De Vero-cellen werden bij 36°C aangehouden in 250 ml-Kimble flessen in hetzelfde medium.

Aan de media werden penicilline, streptomycine (beide van Mycofarm) en natriumbicarbonaat toegevoegd. De kweken werden regelmatig gecontroleerd op mycoplasma met behulp van speciale voedingsbodems (Chanock et al., 1961).

\* De sera werden in ons laboratorium bereid. \*\* van Merck.

### 2.2. Virusstammen

Voor ons onderzoek werd voornamelijk gebruik gemaakt van poliovirus type 1 (Mahoney, 16-de tot 28-ste passage op primaire apenier). In enkele experimenten (hoofdstuk 4 en 5) werd gebruik gemaakt van de virulente prototypen van poliovirus type 1 (Mahoney-stam), poliovirus type 2 (MEF-1-stam) en poliovirus type 3 (Saukett-stam) benevens van virulente en avirulente poliovirusstammen van type 1, 2 en 3 die uit faeces van patienten of uit afvalwater waren geïsoleerd (Verlinde et al., 1970). Deze stammen ontvingen wij van Prof. Dr. J. Verlinde van het Laboratorium voor Medische Microbiologie der Rijksuniversiteit te Leiden.

Ook werden experimenten gedaan met vaccinstammen van poliovirus type 1, 2 en 3 (Sabin-vaccin) die ons ter beschikking waren gesteld door Dr. B. Hofman van het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid (R. I. V.) te Utrecht.

De stammen werden alle in ons laboratorium gepasseerd op primaire apeniercellen.

Na het bereiken van een volledig cytopathologisch effect (CPE) (na ongeveer 24 uur) werden de kweken drie maal bevroren en ontdooid, werd het celdebris afgecentrifugeerd gedurende 20 minuten bij 3000 rpm en werden de supernatants met bicarbonaat gesteld op een pH van ongeveer 7 en bewaard bij  $-20^{\circ}\text{C}$ . De infectiviteitstiter bedroeg 5 tot  $25 \times 10^7$  PFU/ml. Voor gebruik werden de virusinokula gecontroleerd op mycoplasma volgens Chanock et al (1961).

### 2.3. Bereiding van kweken van humane, perifere leukocyten

#### 2.3.1. Kweken van ongezuiverde lymfocyten

De gevolgde methode is afgeleid van die van Moorhead et al.(1967). Van gezonde, volwassen donors werd 50 ml veneus bloed afgenomen in een plastic spuit (Sherwood), voorzien van 2000 E heparine (Organon) en 5 ml 5% dextraanoplossing (Poviet), (Skoog et al , 1956).

Nadat de erythrocyten waren uitgezakt, werd de bovenstaande heldere, leukocytenrijke "buffy coat" overgebracht in niet-gesiliconeerde centrifugebuizen via een daartoe omgebogen injectienaald.

Een derde deel van deze "buffy coat" werd drie maal gewassen (10 min. centrifugeren bij 1000 rpm) met Hanks' BSS (pH 7.2) ter verwijdering van antistoffen tegen poliovirus. De cellen werden daarna opgenomen in TC-medium 199 met 20% foetaal kalfsserum (Flow) en 0,10% (w/v) bicarbonaat. Dit medium werd gedurende 24 uur bij  $36^{\circ}\text{C}$  en 5%  $\text{CO}_2$  in lucht geprefinkubeerd opdat de  $\text{HCO}_3^-$  -  $\text{CO}_2$  buffer zich kon instellen op een pH van 7,2. De celconcentratie werd gesteld op  $4 \times 10^6$  leukocyten/ml. De leukocytensuspensie werd in porties van 0,5 ml uitgevuld in zorgvuldig gereinigde, steriele, cultuurbuizen (10 x 125 mm) (Rwin). De buizen werden afgedekt met losjes aansluitende aluminiumfoliekapjes om gasuitwisseling mogelijk te maken.

#### 2.3.2 Kweken van gezuiverde monocyten

De gevolgde methode is afgeleid van Berman et al (1962) De leukocyten in het resterende, twee derde deel van de onder 2.3.1 beschreven "buffy coat" werden met TC-medium 199, voorzien van 40% foetaal kalfsserum en 0,05% (w/v) bicarbonaat, verdund tot een celconcentratie van  $20 \times 10^6$  leukocyten/ml en in porties van 0,5 ml uitgevuld in cultuurbuizen (10 x 125) (Kimax) met bakelieten schroefdooppen, en gedurende twee uur horizontaal bij  $36^{\circ}\text{C}$  geïnkubeerd. Onder deze omstandigheden hecht het merendeel van de in de leukocytensuspensie aanwezige monocyten zich, door hun oppervlakte-activiteit, aan het glasoppervlak.

Na deze adsorptie-periode werd de bovenstaande suspensie van niet-gehechte celtypen (voornamelijk lymfocyten en polymorfkernige leukocyten) afgeschonken, werden de monocysten drie maal gespoeld met medium en werd, na toevoeging aan de buizen van 0,5 ml medium, bij 36°C geïnkubéerd.

### 2.3.3. Kweken van gezuiverde lymfocyten

De gevolgde zuiveringsprocedure werd beschreven door Lamvik (1966).

De onder 2.3.2. beschreven afgeschonken celsuspensie werd op een kolom (2,5 x 40 cm) volgens Rabinowitz (1964) gebracht, waarin gesiliconeerde (met Siliclad, Clay Adams) nylonwatten (Filtralon, A.R.A.), die gedurende minimaal 1 uur was geprefinkubéerd met het onder 2.3.2. beschreven medium. De kolom was omgeven door een watermantel, waardoor de temperatuur van de kolom op 36°C gehouden kon worden.

Nadat tijdens een inkubatieperiode van 30 minuten de polymorfkernige leukocyten zich, door hun oppervlakte-aktiviteit, samenhangend met hun fagocyterende eigenschappen, aan de nylonwatten hadden gehecht, werden de niet-gehechte lymfocyten met een druppelsnelheid van 1 ml/min. uitgespoeld met het prefinkubatiemedium en opgevangen in gesiliconeerde centrifugebuizen, drie maal gewassen (10 min. centrifugeren bij 1000 rpm) met Hanks' BSS en geresuspendeerd in het onder 2.3.1. beschreven medium tot een concentratie van  $4 \times 10^6$  lymfocyten/ml. Deze suspensie werd in porties van 0,5 ml uitgevuld in kultuurbuizen (10 x 125 mm) en afgedekt met aluminiumfoliekapjes. Aan de beschreven media werden penicilline, streptomycine en een extra hoeveelheid l-glutamine (N.B.C.) toegevoegd.

### 2.3.4. Kweken van polymorfkernige leukocyten

De aan de Filtralon-kolom gehechte polymorfkernige leukocyten (PMN) kunnen worden geëluéerd met behulp van een 0,02%-EDTA (Merck), fosfaat gebufferde zoutoplossing\* zonder calcium en magnesium (Rabinowitz, 1964). De polymorfkernige leukocyten werden drie maal gewassen en geresuspendeerd in het onder 2.3.1. beschreven medium tot een concentratie van  $4 \times 10^6$  cellen/ml. De celsuspensie werd in porties van 0,5 ml per kultuurbuis uitgevuld.

### 2.3.5. Beënten der kweken met virus

De onder 2.3. beschreven celkweken werden beënt met 0,2 ml van een poliovirus-verdunning. Aan controle-buizen werd 0,2 ml medium toegevoegd. De kweken werden vervolgens gedurende 1 uur bij 36°C geïnkubéerd en hierna tot 2 ml aangevuld met het onder 2.3.1. beschreven medium waaraan 0,7% (v/v) phytohemagglutinine (PHA-M, Difco) was toegevoegd, zodat de eindconcentratie van PHA 0,5% (v/v) bedroeg. De celconcentratie was dus tenslotte  $1 \times 10^6$  cellen/ml.

\* Chemikaliën van Merck.

Kontrole-kweken bevatten geen PHA.

De celkweken werden vervolgens bij 36°C in een atmosfeer van 5% CO<sub>2</sub> in lucht en 96% relatieve vochtigheid gekubeerd. De monocytenkweken werden, na beënting, niet tot 2 ml, doch tot 1 ml met het onder 2.3.2 beschreven medium aangevuld en horizontaal gekubeerd bij 36°C.

De dag na het inzetten der kweken werd de overmaat, niet geadsorbeerd, extracellulair virus door een 3 maal herhaalde wasprocedure (10 min. centrifugeren bij 1000 rpm) met Hanks' BSS, verwijderd en werden de kweken opnieuw ververst met 1 ml medium met of zonder 0,5% PHA. De buizen voor de bepaling der DNA-synthese werden niet gewassen en het niet-geadsorbeerde virus bleef daarin gedurende de gehele kweekperiode aanwezig. Dit had geen invloed op de resultaten.

De kweken werden na 5 à 6 dagen beëindigd.

Tijdens de verschillende fasen van de procedure werden cellellingen verricht met behulp van een hemocytometer volgens Bürker-Türk en werd de vitaliteit der cellen bepaald met behulp van de trypaanblauw'-exclusie methode (Black et al., 1964)

Uitstrijkpreparaten ter bepaling van de differentiële samenstelling der celsuspensies en de zuiveringsgraad, werden gekleurd volgens May-Grünwald-Giemsa.\*

\* kleurstoffen van Merck.

#### 2.4. Bereiding van kweken van humane, tonsillaire lymfocyten

De gevolgde methode is afgeleid van die van Eustatia (1971).

De operatief verwijderde tonsillen werden opgevangen in Hanks' BSS met 20% kalfsserum en hiermee drie maal gespoeld. In een steriele petrischaal met medium werden de tonsillen met behulp van een steriele skalpel en pincet gefragmenteerd. De hierbij ontstane lymfocytensuspensie werd via een steriele, roestvrij stalen zeef overgebracht in niet-gesiliconeerde centrifugebuizen en drie maal gewassen (10 min. centrifugeren bij 1000 rpm) met medium. De hierna volgende procedure is gelijk aan die beschreven voor de bereiding en beënting van perifere leukocytenkweken onder 2.3., met dien verstande dat de eindconcentratie PHA werd gebracht op 1% (v/v) en extra hoeveelheden antibiotika werden toegevoegd.

#### 2.5. Bepaling van celmorfologie en differentiële samenstelling

Op verschillende tijdstippen van de kweekperiode werden monsters genomen, waarvan met behulp van een cytocentrifuge sedimentatiepreparaten werden vervaardigd volgens van Helden (1971). De preparaten werden gekleurd volgens May-Grünwald-Giemsa. De lymfocyten, polymorfkernige leukocyten en mono-

cyten laten zich in deze preparaten duidelijk onderscheiden volgens Hayhoe en Flemans (1969).

Het differentiëren der lymfoblasten geschiedde volgens criteria van Yoffey et al. (1965), dat van de monocyt-makrofagen volgens Berman et al. (1962).

Lymfoblasten worden van makrofagen voornamelijk onderscheiden door hun grote kern/cytoplasma-ratio en de aanwezigheid van nucleoli in de ronde, centrisch gelegen leptochromatische kern.

## 2.6. Bepaling van DNA- en RNA-synthese

### 2.6.1. Bepaling van DNA-synthese

De gevolge procedure is afgeleid van Caron et al. (1965).

De DNA-synthese der kweken werd bepaald aan de hand van de inkorporatie van getritieerd thymidine (TdR- $6^3\text{H}$ , specifieke aktiviteit 5.0 Ci/mmol, Radiochemical Centre, Amersham). Op bepaalde tijdstippen tijdens de kweekperiode werd aan minimaal drie buizen 1  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -thymidine toegevoegd en vervolgens gedurende 5 uur bij  $36^\circ\text{C}$  en 5%  $\text{CO}_2$  in lucht geïnkubeerd.

Na de labelingsperiode werd de inkorporatie afgebroken door de buizen gedurende 10 minuten in ijs te plaatsen. De cellen werden vervolgens gedurende 10 min. afgecentrifugeerd bij 1000 rpm.

De supernatant werd afgezogen en het celsediment een maal gewassen (10 min. centrifugeren bij 1000 rpm) met een ijskoude oplossing van 0,5% EDTA in een met fosfaat gebufferde zoutoplossing zonder  $\text{Ca}^{++}$  en  $\text{Mg}^{++}$ . De monsters werden tot nadere bewerking bij  $-20^\circ\text{C}$  bewaard. Voor de partiële extractie van het cellulaire DNA werd, behoudens enkele wijzigingen, de methode volgens Kinard (1957) gebruikt. De zuuroplosbare fraktie werd hierbij verwijderd door een wasprocedure met 5 ml ijskoude 5%-trichloorazijnzuur (TCA)-oplossing (Merck). Het zuuronoplosbare precipitaat werd gedurende 10 min. bij 3000 rpm gesedimenteerd, opgelost in 1 ml 0,1 N NaOH (Merck), opnieuw geprecipiteerd met 4,5 ml. 6,7% TCA-oplossing en opnieuw gesedimenteerd.

De supernatant werd zorgvuldig verwijderd en aan het sediment werd 1 ml aceton-ethermengsel (1 : 1) (Merck) toegevoegd en, na centrifugeren gedurende 10 min. bij 1000 rpm en afschenken van de supernatant, in een waterbad van  $40^\circ\text{C}$  gedurende 15 min. drooggedampt. Het nu geheel droge sediment werd vervolgens onder krachtig roeren met een Vortex opgelost in 0,1 ml hyamine hydroxide 10-X (Packard).

Na inkubatie gedurende 15 min. bij  $40^\circ\text{C}$  werd de oplossing gemengd met scintillatievloeistof\* en overgeschonken in speciale telpotjes (Amphabel).

\* Samenstelling scintillatievloeistof (volgens Bray, 1960)

Xyleen (Merck): 1000 ml, Dioxaan (Merck): 1000 ml, Ethanol (Merck) 600 ml,

Naphtaline (Merck): 156 gr; P.P.O. (Packard): 13 gr,  $\alpha$  N.P.O. (Packard): 0,13 gr.

Een volume van 12,5 ml scintillatievloeistof per telpotje gaf het optimale telrendement. De activiteit werd gemeten in een automatische scintillatieteller (Packard 3380) met  $^3\text{H}$ -quick-set instelling (Packard, 1958). De doving in elk potje werd bepaald met de externe standaard-methode (De Wachter et al., 1966). De activiteit werd uitgedrukt in counts per minute (cpm) per buis.

#### 2.6.2. Bepaling van RNA-synthese

In enkele experimenten (hoofdstuk 5) werd eveneens de RNA-synthese bepaald. De bepaling van de RNA-synthese geschiedde aan de hand van de inbouw van getriticerd uridine (UR-5- $^3\text{H}$  specifieke activiteit 5,0 Ci/mmol, Radiochemical Centre, Amersham). De labeling en extractie werden uitgevoerd volgens de procedure die beschreven is voor de DNA-synthese bepaling met dien verstande dat de extractie in ijs werd uitgevoerd en er in een koelcentrifuge (Servall) bij  $0^\circ\text{C}$  werd gecentrifugeerd.

#### 2.7. Virustitraties

Voor de infectiviteitsbepaling werd gebruik gemaakt van de plaque-methode volgens Dulbecco et al., (1954). De titratie van poliovirus werd uitgevoerd op konfluente monolayers van Vero-cellen in Falcon plastic petrischaaltjes (60 x 15 mm). Van de virusmonsters werd een tienvoudige verdunningsreeks gemaakt en van iedere verdunning 0,2 ml per schaalteje geënt (in triplo). De schaaltejes werden vervolgens gedurende 1 uur bij  $36^\circ\text{C}$  geplaatst. Hierna werden ze voorzien van 4 ml medium-agaroverlay. Dit medium bestond uit Minimal Essential Medium (Gibco) (Eagle, 1959) met 10% kalfsserum, 1,25% (w/v) Bacto-Agar (Difco) en 0,003% (w/v) Neutraal Rood (Difco) en antibiotika, bicarbonaat en een extra hoeveelheid l-glutamine.

De petrischaaltjes werden gedurende 4 dagen bij  $36^\circ\text{C}$  en 5%  $\text{CO}_2$  in lucht en 98% relatieve vochtigheid geïnkubeerd en de toename van het aantal plaques werd dagelijks bepaald.

Voor een zo nauwkeurig mogelijke bepaling dienen er tussen 10 en 100 plaques per schaalteje te zijn. De titers werden uitgedrukt in Plaque-Forming-Units (PFU) per ml. Bij iedere titratie werd een virussuspensie met bekende titer meegetitreerd, teneinde de gevoeligheid van het systeem te kunnen schatten.

##### 2.7.1. Bepaling van de totale hoeveelheid virus in de leukocytenkweken

De betreffende kweken werden 3x bevroren en ontdooid en het celdebris werd gedurende 10 min. bij 3000 rpm afgecentrifugeerd. Van de supernatants werd de titer bepaald als boven omschreven.

2.7.2 Bepaling van het percentage geïnfecteerde cellen in de leukocytenkweken  
De gevolgde methode is afgeleid van Gresser et al.(1964).

Op bepaalde tijdstippen tijdens de kweekperiode werden de betreffende kweken 2x gewassen (10 min. centrifugeren bij 1000 rpm) met Hanks' BSS en gedurende 30 min. bij 36°C geïnkubiseerd met, bij 56°C geïnactiveerd, type-specifiek antiserum waarna de cellen nogmaals 3x werden gewassen en gesuspenderd in 1 ml Hanks' BSS. Van deze celsuspensie werd een 10-voudige verdunningsreeks gemaakt en van iedere verdunning werd 0,2 ml per schaalje met Vero-cellen genomen. Met behulp van de hemocytometer werd de concentratie van de celsuspensie bepaald en aan de hand van het aantal getelde plaques per schaalje het percentage geïnfecteerde cellen berekend. Bij iedere titratie werd gecontroleerd of het antiserum het extracellulaire virus voldoende had geneutraliseerd.

## 2.8. Virusinactivatie

Voor de bereiding van een suspensie van geïnactiveerd poliovirus werden petri-schaaltjes (60 x 15 mm) gevuld met 2 ml van een onverdunde virussuspensie ( $5 - 25 \times 10^7$  PFU/ml), en gedurende 30 min. op een afstand van 10 cm onder een UV-lamp geplaatst

Deze behandeling reduceerde de infectiviteit tot ongeveer 10 PFU/ml.

## 2.9. Titratie van antistoffen

Titers van antistoffen tegen poliovirus in het serum van de donors werden bepaald door middel van de plaque-reduktiemethode, volgens French et al (1959).

Van de te onderzoeken sera werd een tienvoudige verdunningsreeks gemaakt, 0,5 ml van elke verdunning werd gemengd met 0,5 ml virussuspensie die 250 PFU poliovirus bevat. Het mengsel werd gedurende 30 min. bij 36°C geïnkubiseerd.

Van het virus-serummengsel werd 0,2 ml per schaalje genomen (triplo), zodat er maximaal ongeveer 50 plaques per schaalje kunnen zijn. De hoogste verdunning welke een reductie van tenminste 90% van het aantal plaques veroorzaakte, werd beschouwd als de antistoftiter.

## 2.10. Interferonbepaling

Interferon werd getitreerd door middel van de plaque-reduktiemethode volgens Merigan (1971), op monolayers van humane, diploïde embryonale longcellen (N<sub>3</sub>) (Hayflick et al., 1961) en met behulp van VSV (Indiana serotype)\*.

De reciproke waarde van die interferonverdunding welke een reductie van 50% van het aantal verwachte VSV-plaques geeft, werd als titer beschouwd.

\* Afkomstig van Prof. Dr. R. Gispén van het Rijks Instituut voor de Volksgezondheid te Utrecht.





### Hoofdstuk 3. Onderzoek naar de cultuurkondities voor een optimale PHA-respons en naar de reproduceerbaarheid der methoden

#### 3.1. Inleiding

Hoewel de PHA-stimulatie van humane lymfocyten onderwerp van vele onderzoeken is (zie Elves, 1966a, Naspitz et al., 1968, Ling, 1968), is er relatief weinig gedaan aan een grondige kwantificering van het systeem. Slechts enkele onderzoekers maakten een uitgebreide en systematische analyse van de cultuurkondities van de lymfocyt en de reproduceerbaarheid der bepalingmethoden van de PHA-respons (Wilson, 1966, Moorhead et al., 1967, Schellekens et al., 1968, Fitzgerald, 1971). Ook de labelingskondities van de  $^3\text{H}$ -thymidineïnkorporatie, gebruikt als parameter der PHA-respons, werden slechts partieel onderzocht (Hartog et al., 1967, Bain, 1970, Sample et al., 1971). Daar de resultaten van deze onderzoeken niet in alle opzichten overeenstemmen, leek het ons wenselijk om, alvorens met het onderzoek naar de interactie van poliovirus en al of niet met PHA gestimuleerde lymfocyten te beginnen, een oriënterend onderzoek te doen naar de "normale" PHA-respons van humane lymfocyten, afkomstig van gezonde donors en naar de factoren welke hierop van invloed zijn.

Aangezien het gebruik van tonsillaire lymfocyten voordelen leek te hebben boven dat van perifere lymfocyten, daar de tonsil een relatief gemakkelijk te verkrijgen bron vormt van grote aantallen lymfocyten van één en dezelfde donor, werd, nadat voor beide de optimale cultuurkondities waren vastgesteld, het mogelijke verschil in PHA-reaktiviteit tussen tonsillaire en perifere lymfocyten onderzocht.

Bovendien werd de methode die werd gebruikt ter kwantificering van de PHA-respons- de bepaling van de DNA-synthese aan de hand van de inbouw van een radioactieve precursor-systematisch geanalyseerd op die factoren welke de reproduceerbaarheid en de gevoeligheid beïnvloeden, en werd een optimale labelingsprocedure vastgesteld en de methode gestandaardiseerd. Eveneens werd een oriënterend onderzoek gedaan naar de factoren welke de gevoeligheid en nauwkeurigheid bepalen van de virustitratiemethode de plaque-methode (Dulbecco et al., 1954, Younger, 1956, Berg et al., 1963) (Reviews Cooper, 1961b, Lorenz, 1962).

#### 3.2 Bereiding der leukocyten suspensies

Onder hoofdstuk 2 werden de procedures beschreven op welke wijze de ongezuiverde leukocyten suspensies en de verschillende gezuiverde frakties hieruit, zoals lymfocyten, polymorfkernige leukocyten (PMN) en monocysten werden ver-

kregen. De kwantitatieve gegevens met betrekking tot opbrengst, verlies tijdens bereiding, vitaliteit, erythrocytenverontreiniging, differentiële samenstelling en zuiverheidsgraad worden samengevat in tabel 1. Weergegeven zijn de gemiddelden plus of min de standaard afwijking van alle uitgevoerde experimenten (n = 200).

Uit de tabel blijkt dat de uiteindelijke zuiverheidsgraad der lymfocyten ongeveer 93% bedraagt. In de uiteindelijk gezuiverde lymfocytensuspensies bedraagt de fractie PMN ongeveer 7%. Ook de aanwezigheid van monocytën is in gezuiverde lymfocytensuspensies niet geheel uit te sluiten. Bij differentiatie van 500 tot 1000 cellen, in plaats van het routine-matige 100-tal, werden nog monocytën waargenomen (<1%). Ook andere auteurs wijzen op de "verontreiniging" met monocytën in kolom-gezuiverde lymfocytensuspensies (Oppenheim et al., 1968; Seeger et al., 1970, Alter et al., 1970, Shortman et al., 1971).

De "verontreiniging" der suspensies met erythrocyten, ongeveer 54%, is weliswaar hoog, doch bleek geen consequenties te hebben voor de PHA-respons

Door een hemolytische behandeling met een oplossing van 0,83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in 0,01 M  $\text{KHCO}_3$ , kon deze verontreiniging overigens worden gereduceerd tot ongeveer 3%.

Op de tonsillaire lymfocytensuspensies heeft de zuiveringsprocedure nauwelijks effect, daar deze suspensies bij aanvang reeds voor ongeveer 98% uit lymfocyten zijn samengesteld.

De vitaliteit der cellen ondergaat geen nadelige invloed der zuiveringsprocedure deze blijft ongeveer 99%. Het uiteindelijke celverlies is aanzienlijk na het wasen van de "buffy coat" verliezen we reeds ongeveer 35% en na de kolomzuivering ongeveer 70% van het aanvankelijk aanwezige aantal leukocyten. Hoewel de monocytën zich hechten aan het glasoppervlak der Kimaxbuizen, tijdens de bereiding van gezuiverde monocytënkweken, treedt na de 2 uur durende adsorptieperiode nagenoeg geen wijziging op in de samenstelling der leukocytensuspensie, vanwege de geringe bijdrage (ongeveer 5%) welke de monocytën leveren aan de totale hoeveelheid cellen. De "verontreiniging" van de monocytënkweken met lymfocyten bleek gering te zijn (zie hoofdstuk 4).

Uit onze experimenten bleek het al of niet siliconeren van het te gebruiken glaswerk tijdens de suspensiebereiding een relatief belangrijke faktor te zijn. Het liet zich afleiden dat fagocyterende celtypen, zoals polymorfkernige leukocyten en monocytën op een selektieve wijze aan gesiliconeerde oppervlakten werden geadsorbeerd. Bij gebruik van gesiliconeerd glaswerk trad dan ook een tendens tot een groter celverlies en een verschuiving van de differentiële samenstelling der suspensies ten gunste van de lymfocytenfractie op. Ook Wildy et al. (1958) kwamen tot de bevinding dat gesiliconeerd glaswerk resulteerde in een hoger percentage lymfocyten in de door hen toegepaste zuiveringsprocedure.

Tabel 1. Kwantitatieve gegevens betreffende de zuiveringsprocedure der leukocyten suspensies

Perifere lymfocyten		Tonsillaire lymfocyten
<b>A V66r wassen</b>		
Opbrengst <sup>1)</sup>	$(182 \pm 58) \times 10^6 / 50 \text{ ml bloed}$	$(400 \pm 200) \times 10^6 / \text{tonsil}$
Vitaliteit <sup>2)</sup>	$99\% \pm 1\%$	$97\% \pm 2\%$
Differentiatie <sup>3)</sup>	$L: 45\% \pm 12\%, M: 6\% \pm 3\%$	$L: 98\% \pm 1\%, M < 1\%$
Ery-Kontaminatie <sup>4)</sup>	$54\% \pm 13\%$	$14\% \pm 10\%$
<b>B Na 3x wassen</b>		
Verlies <sup>5)</sup>	$35\% \pm 14\%$	$38\% \pm 16\%$
Vitaliteit	$99\% \pm 1\%$	$98\% \pm 2\%$
Differentiatie	$L: 50\% \pm 12\%, M: 4\% \pm 3\%$	$L: 98\% \pm 1\%, M < 1\%$
Ery-Kontaminatie	$54\% \pm 13\%$	$14\% \pm 10\%$
<b>C Na adsorptie aan Kimax buizen 2 uur bij 37°C</b>		
Verlies	$40\% \pm 8\%$	
Vitaliteit	$99\% \pm 1\%$	
Differentiatie	$L: 54\% \pm 10\%, M < 1\%$	
Ery-Kontaminatie	$54\% \pm 13\%$	
<b>D Na kolomzuivering</b>		
Verlies	$69\% \pm 9\%$	$48\% \pm 14\%$
Vitaliteit	$99\% \pm 1\%$	$98\% \pm 2\%$
Differentiatie	$L: 93\% \pm 4\%, M < 1\%$	$L: 98\% \pm 1\%, M < 1\%$
Ery-Kontaminatie	$50\% \pm 10\%$	$10\% \pm 7\%$

Weergegeven zijn de gemiddelden  $\pm$  standaardafwijking van alle uitgevoerde experimenten (n = 200).

1) Opbrengst aan leukocyten

2)  $\frac{\text{Aantal levende leukocyten per ml}}{\text{Totaal aantal leukocyten per ml}} \times 100\%$

3) Per 100 getelde leukocyten  
 $\% \text{ PMN} = 100\% - (\%L + \%M)$

4)  $\frac{\text{Aantal erythrocyten per ml}}{\text{Totaal aantal cellen per ml}} \times 100\%$

5)  $100\% - \left( \frac{\text{Celopbrengst na B, C of D}}{\text{Celopbrengst bij A}} \times 100\% \right)$

Verklaring der afkortingen:

L: Lymfocyt; M: Monocyt; PMN: Polymorfkernige leukocyt

Met gesiliconeerde nylonwatten in de kolom werd een significante (t-toets,  $p < 5\%$ ) hogere zuiveringsgraad der lymfocyten ( $93\% \pm 4\%$ ) verkregen dan wanneer niet-gesiliconeerde nylonwatten werden gebruikt ( $86\% \pm 8\%$ ), ( $n = 15$ ). Resumerend kan worden gezegd dat, indien men ongezuiverde leukocyten-suspensies wenst, het contact met gesiliconeerd glaswerk vermeden dient te worden terwijl, wanneer gezuiverde lymfocyten-suspensies nodig zijn, gesiliconeerd glaswerk juist de voorkeur verdient, zoals door Rabinowitz (1964) in navolging van Garvin (1961) overigens al werd aangegeven.

### 3.3. "Normale" PHA-respons en factoren welke daarop van invloed zijn

#### 3.3.1. Kultuurkondities

Uitgaande van de methode volgens Moorhead et al.(1967) werden de volgende variabelen onderzocht op hun effect op de PHA-respons van ongezuiverde lymfocyten van perifere zowel als van tonsillaire oorsprong.

- a) de invloed van het gebruik van TC medium 199, volgens Morgan (1950) of Minimal Essential Medium volgens Eagle (1959)
- b) de invloed van het gebruik van foetaal, nuchter of normaal kalfsserum
- c) de invloed van de serumconcentratie: 5%, 10% of 20%
- d) de invloed van de concentratie natrium-bicarbonaat voor het handhaven van een optimaal gebufferde pH
- e) de invloed van de celconcentratie

Elke variabele werd in minimaal 3 experimenten met gepaarde waarneming onderzocht. De DNA-synthese - uitgedrukt als cpm/buis -, bepaald op de op-eenvolgende dagen der kweekperiode, werd als parameter gebruikt. De resultaten van dit oriënterende onderzoek worden kort samengevat (zie tabel 2). De onderzochte variabelen bleken op zowel perifere als tonsillaire lymfocyten dezelfde invloed te hebben.

Ad a. Medium 199 geeft een significant (t-toets,  $p < 5\%$ ) hogere respons dan MEM. De maximale PHA-respons ligt op de vierde dag. In tegenstelling hiermee vonden Schellekens et al (1968) geen noemenswaardig verschil tussen Medium 199 en MEM.

Ad b De resultaten met betrekking tot het serum waren minder eenduidig. Aanvankelijk bleek in de oriënterende experimenten nauwelijks enig verschil te bestaan tussen foetaal, nuchter en normaal kalfsserum om deze reden besloten wij nuchter kalfsserum te gebruiken. Tijdens het onderzoek bleek echter dat er aanzienlijke verschillen bestonden tussen de verschillende batches nuchter kalfsserum met betrekking tot de mate waarin zij de PHA-respons beïnvloedden. Het werd duidelijk dat de verschillen tussen de verschillende batches foetaal kalfsserum veel minder waren dan die bij gebruik van de beide andere sera. Deze bevindingen deden ons, gedurende ons onderzoek, besluiten om alsnog over te gaan op foetaal kalfsserum. Voor het effect van poliovirus op de PHA-respons bleek dit overigens van geen belang (zie hoofdstuk 4) Bij gebruik van foetaal kalfsserum bleek de "background" waarde (d.i. de activiteit welke waargenomen wordt in niet met PHA gestimuleerde kweken) steeds hoger te liggen dan bij gebruik van beide andere sera, hetgeen ook reeds door Johnson et al.(1965) werd waargenomen.

Ad c: De tendens kon worden waargenomen dat bij gebruik van lagere concentraties serum een hogere respons optrad. De verschillen in respons bij gebruik van verschillende concentraties serum waren echter, bij het aantal uitgevoerde experimenten, niet significant. Bij gebruik van 5% serum nam de vitaliteit in de kweken na de 3de dag plotseling sterk af. Klaarblijkelijk wordt na de derde dag deze lage serumconcentratie beperkend. Cooperband et al., (1967) suggereren dat het serum een dubbele functie vervult: enerzijds verstrekt het de voor de PHA-respons noodzakelijk nutrienten, anderzijds bevat het factoren die de PHA-respons remmen (waarschijnlijk immunosuppressieve  $\alpha$ -globulinen, Cooperband et al., 1968).

Ad d: 0, 10% (w/v) natriumbicarbonaat bleek de optimale concentratie te zijn. Lagere bicarbonaatconcentraties bufferen te zwak, zodat de met PHA gestimuleerde lymfocytenkweken na 2 à 3 dagen duidelijk te zuur gaan worden. Hogere concentraties zijn schadelijk voor de cellen. Het bleek dat bij gebruik van 0, 10% (w/v) bicarbonaat de pH van de buffer zich eerst na ongeveer 12 uur had ingesteld op een konstante, fysiologische pH van 7,2. Het te gebruiken onderhoudsmedium werd daarom dan ook, alvorens de lymfocyten erin te suspenderen, gedurende minimaal 12 uur in de 5% CO<sub>2</sub>-stoof geprefnubeerd.

Ad e:  $1 \times 10^6$  cellen per ml bleek de meest geschikte celconcentratie te zijn. Verdere toename van de celconcentratie gaf geen proportionele toename van de respons. Ook door andere onderzoekers werd gewezen op deze invloed van de celconcentratie (Tormey et al., 1965; Moorhead et al., 1967; Schellekens et al., 1968; Freiesleben Sørensen et al., 1969).

### 3.3.2. Kinetiek der PHA-respons

Met betrekking tot de kinetiek der PHA-respons bleken er opvallende verschillen te bestaan tussen tonsillaire en perifere lymfocyten. Ook andere auteurs wezen reeds op de verschillen in de PHA-respons tussen lymfocyten afkomstig uit het bloed en uit verschillende lymfoïde organen (zie Reviews, Naspitz et al., 1968; Ling, 1968). Weber (1968) verklaart deze verschillen door aan te nemen dat de lymfocyten-samenstelling in PHA-gevoelige en PHA-ongevoelige cellen van orgaan tot orgaan verschilt. Uit onderzoekingen van o. a. Janossy et al., (1971) werd duidelijk dat het vooral de thymus-afhankelijke lymfocyten zijn die op PHA reageren.

De onderzochte variabelen werden in minimaal drie afzonderlijke experimenten met gepaarde waarneming onderzocht. De resultaten van ons onderzoek worden kort samengevat.

Tabel 2. Onderzoek naar de cultuurkondities voor een optimale PHA-respons van ongezuiverde perifere lymfocyten

Variabelen	DNA-synthese <sup>1)</sup> $\bar{c}pm \pm v.c.$	p <sup>2)</sup> (t-toets)
a) Medium 199 MEM	$140 \times 10^3 \pm 54\%$ $95 \times 10^3 \pm 53\%$	< 5%
b) KAS nKAS f KAS	$125 \times 10^3 \pm 52\%$ $85 \times 10^3 \pm 58\%$ $110 \times 10^3 \pm 55\%$	ns
c) 5% nKAS 10% nKAS 20% nKAS	$100 \times 10^3 \pm 55\%$ $120 \times 10^3 \pm 58\%$ $110 \times 10^3 \pm 55\%$	ns
d) 0,1% NaHCO <sub>3</sub> 0,15% NaHCO <sub>3</sub>	$110 \times 10^3 \pm 60\%$ $80 \times 10^3 \pm 41\%$	< 5%
e) $0,5 \times 10^6$ cellen/ml $1,0 \times 10^6$ cellen/ml $2,0 \times 10^6$ cellen/ml	$40 \times 10^3 \pm 62\%$ $85 \times 10^3 \pm 50\%$ $100 \times 10^3 \pm 75\%$	} < 5% } ns

Weergegeven zijn de gemiddelden  $\pm$  variatiecoëfficiënt van minimaal 3 experimenten met gepaarde waarneming

- 1) Weergegeven het maximum der DNA-synthese, deze lag voor alle onderzochte variabelen op de 4de dag na stimulatie met PHA, behalve voor het medium met 5% nKAS, waarin dit maximum op dag 3 lag
- 2) Signifikantie bepaald met behulp van t-toets van Student voor gepaarde waarneming.

Uitgangskondities Medium 199, 20% nKAS, 0,5% PHA, 0,1% NaHCO<sub>3</sub>,  
 $1 \times 10^6$  cellen/ml, 2 ml celsuspensie per buis.



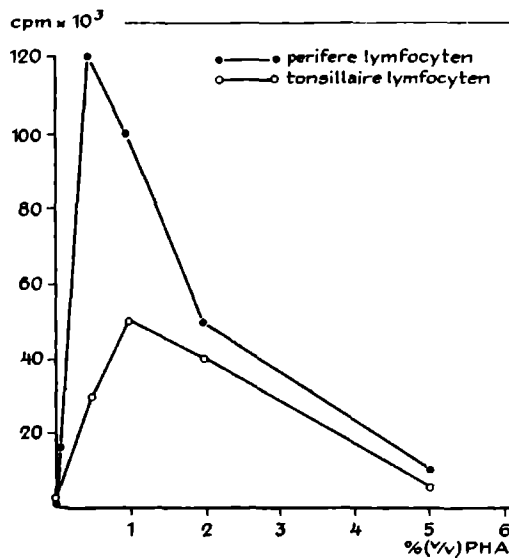
In figuur 1 zijn de dosis-respons kurven voor zowel perifere als tonsillaire lymfocyten weergegeven. De optimale PHA-dosis voor perifere lymfocyten bedraagt 0,5%, terwijl voor tonsillaire lymfocyten, hoewel het werkingsgebied breder lijkt, de optimale dosis 1,0% van de standaard PHA-oplossing is. Ook door andere onderzoekers werd een optimale PHA-koncentratie gevonden (Tormey et al., 1965, Richter et al., 1967, Schellekens et al., 1968, Simmons et al., 1969).

Naast de faktor die verantwoordelijk is voor de mitogene eigenschappen van het PHA, bevat het PHA-extrakt klaarblijkelijk ook een komponent die bij het bereiken van een bepaalde konzentratie cytotoxisch werkt (Hirschhorn et al., 1967). Indien het PHA rigoureus gezuiverd wordt, blijkt deze cytotoxische aktiviteit en daarmee het optreden van een optimum te zijn geëlimineerd (Goldberg et al., 1970).

Daar het voor een aantal experimenten tijdens ons onderzoek (hoofdstuk 5) noodzakelijk bleek PHA op verschillende tijdstippen na het inzetten der kweken (op dag 0) toe te voegen dan wel juist weg te wassen, werd in een drietal experimenten nagegaan wat het effekt van deze handelingen was op de "normale" PHA-respons. Terwijl perifere lymfocyten zich op opeenvolgende dagen met PHA lieten stimuleren en de optimale respons steeds 4 dagen na stimulatie optrad, bleef de respons van tonsillaire lymfocyten suboptimaal na stimulatie vanaf dag 1. Na de zesde dag treedt er, ongeacht het moment van PHA-toevoeging, een daling op in de PHA-respons van perifere lymfocyten, veroorzaakt door de dan eveneens manifest wordende scherpe daling van de vitaliteit der kulturen.

In tegenstellingen met de bevindingen van andere auteurs (Lang et al., 1967, Kay, 1967, Simmons et al., 1969), die vonden dat PHA slechts gedurende een bepaalde tijd aanwezig behoeft te zijn om een optimale respons op te wekken, bleek uit onze experimenten dat na wegwassen van PHA op dag 1, de respons suboptimaal was, een resultaat dat overeenstemt met dat van Tormey et al. (1965), Yamamoto (1966) en Jasinska et al. (1970).

Kay (1967) oppert de mogelijkheid dat deze verschillen te wijten zouden zijn aan de verschillen tussen de twee in de handel zijnde PHA preparaten (PHA-M(ucoproteïne) en PHA-P(roteïne)), preparaten met een verschillende zuiverheidsgraad.



Figuur 1. Dosis-respons kurven voor PHA van ongezuiverde perifere en tonsillaire lymfocyten.

Weergegeven zijn de gemiddelden van 2 x 3 experimenten.

Buizen, in triplo, met de verschillende concentraties PHA, werden na een inkubatieperiode van 96 uur, gedurende 5 uur gelabeld met 1  $\mu$ Ci/buis  $^3\text{H}$ -TdR (Spec. Akt. 5 Ci/mmol).

### 3.3.3. Biologische variabiliteit van het systeem

Tijdens het onderzoek bleek dat de PHA-respons tussen de verschillende experimenten een aanzienlijke variatie vertoonde. De maximale PHA-respons bleek gelegen te zijn tussen ongeveer  $10 \times 10^3$  tot  $250 \times 10^3$  cpm per buis.

Anderen wezen reeds op deze grote mate van biologische variabiliteit van humane lymfocyten, die een extra moeilijkheid vormt bij de kwantificering van het systeem (Salzman et al., 1966; Richter et al., 1967; Simmons et al., 1969; McIntyre et al., 1969; Fitzgerald, 1972).

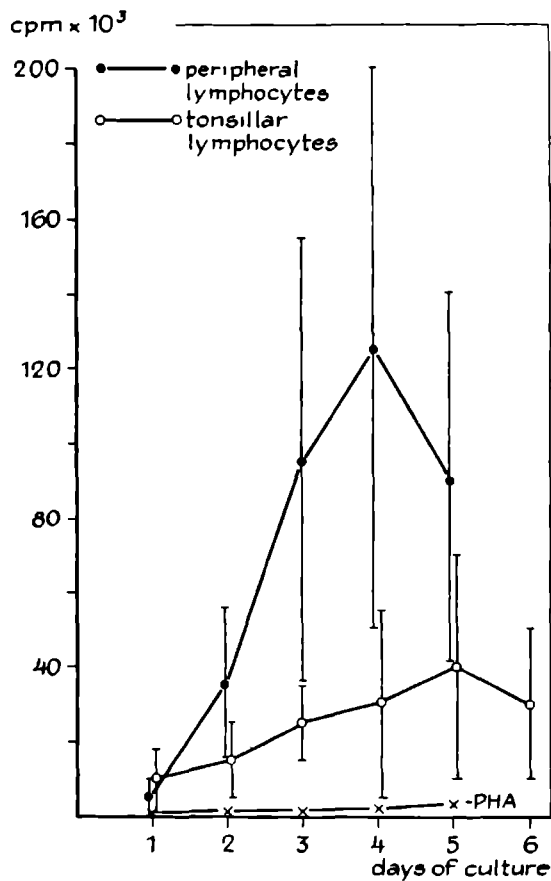
Hiervoor kunnen verschillende oorzaken genoemd worden zoals een verschillende donor-afhankelijke PHA-gevoeligheid van de lymfocyten, mede afhankelijk van sexe, leeftijd, fysiologische konditie, hormoonbloedspiegel, gebruik van antibiotika en farmaka etc. (zie Review Naspit et al., 1968; Ling, 1968). Bovendien zullen variaties in de cultuurkondities, die onmogelijk volledig konstant zijn te houden, een rol spelen. Zo bleek met name het serum een bron van mogelijke variabiliteit te zijn. Ook is het stimulerende vermogen van de verschillende PHA preparaten niet altijd hetzelfde (zie ook Elves et al., 1962). Overigens dient hierbij te worden opgemerkt dat het patroon van de PHA-respons van perifere lymfocyten veel uniformer is dan dat van tonsillaire lymfocyten, in die zin dat de maximale PHA-respons van perifere lymfocyten, na stimulatie op dag 0, zonder uitzondering op de vierde dag viel, terwijl bij gebruik van tonsillaire lymfocyten een maximale respons werd waargenomen van de derde tot en met de zesde dag na stimulatie op dag 0.

In figuur 2 worden de "gemiddelden kurven", ("Normale" PHA-respons), welke ontstaan door de gemiddelden van de uitkomsten van de verschillende experimenten op het betreffende tijdstip met elkaar te verbinden, getoond. Ook de standaardafwijkingen zijn weergegeven. De variabiliteit in de gemiddelde maximale PHA-respons van perifere lymfocyten tussen de verschillende onster beschikking staande donors (20) kon berekend worden op  $\pm 60\%$  (= donor-variabiliteit); de gemiddelde variabiliteit in de maximale PHA-respons van perifere lymfocyten van eenzelfde donor, gemeten in verschillende perioden, op  $\pm 65\%$  (= fysiologische variabiliteit).

### 3.3.4. Invloed der kolom-zuivering op de PHA-respons

Een aanzienlijke invloed op de PHA-respons van perifere lymfocyten bleek de zuiveringsprocedure via passage over de Filtralonkolom te hebben.

In een twaalfstal experimenten met gepaarde waarneming toonden de ongezuiverde lymfocytensuspensies een hogere maximale PHA-respons (gemiddeld  $90 \times 10^3 \pm 80\%$ ) dan de gezuiverde lymfocytensuspensies (gemiddeld  $44 \times 10^3 \pm 54\%$ ), (t-toets,  $p < 2,5\%$ ).



Figuur 2. "Normalc" PHA-respons van ongezuiverde, perifere en tonsillaire lymfocyten.

Weergegeven zijn de gemiddelden  $\pm$  standaardafwijking van 23 experimenten met perifere lymfocyten -met 0,5% (v/v) PHA- en van 21 experimenten met tonsillaire lymfocyten -met 1,0% (v/v) PHA-, waarin dagelijks de <sup>3</sup>H-TdR inkorporatie werd bepaald (labeling 5 uur met 1  $\mu$ Ci/buis <sup>3</sup>H-TdR, Spec. Akt. 5 Ci/mmol).

Voor stimulatie van gesensibiliseerde lymfocyten met specifieke antigenen werd aangetoond dat een bepaalde celfractie, welke verwijderd wordt tijdens de zuiveringsprocedure via een kolom, in de literatuur aangeduid als de zogenaamde "adherent cells" (A.C.) noodzakelijk zou zijn voor deze vorm van lymfocytenstimulatie (Hersh et al., 1968; Oppenheim et al., 1968; MacFarland., 1969; Alter et al., 1970). Er zijn duidelijke aanwijzingen dat deze noodzakelijke celfractie de monocyt-makrofaag betreft (Seeger et al., 1970; Alter et al., 1970). Sommige onderzoekers beweren dat ook voor een optimale PHA stimulatie deze A.C. -fractie noodzakelijk is (Wilson, 1966; Oppenheim et al., 1968; Lewis et al., 1970; Alter et al., 1970). Onze resultaten bevestigen deze veronderstelling.

### 3.3.5. Konklusies en commentaar

- a) Op basis van de resultaten in de voorgaande paragrafen, werden voor ons onderzoek de cultuurkondities voor een optimale PHA-respons van perifere lymfocyten vastgesteld zoals werd beschreven onder Materiaal en Methoden (2.3.). Een beoordeling van de variabelen vindt men in de tekst.
- b) Er bleek een grote mate van variabiliteit te bestaan in de PHA-respons tussen de verschillende experimenten; om deze reden zullen wij ons onderzoek naar de lymfocyt-virusinteractie uitvoeren met behulp van experimenten met "gepaarde waarneming".\*
- c) Uit de resultaten bleek dat gezuiverde perifere lymfocyten een significant lagere PHA-respons vertonen dan ongezuiverde perifere lymfocyten, hetgeen werd toegeschreven aan het "ontbreken" van de monocytfractie in gezuiverde lymfocytensuspensies.
- d) Het bleek dat tonsillaire lymfocytenkweken zich minder goed laten stimuleren door PHA dan perifere leukocytenkweken. Allereerst behoeven zij een hogere PHA-dosis voor een optimale respons en bovendien ligt de maximale respons van tonsillaire lymfocytenkweken gemiddeld lager dan die van perifere leukocytenkweken. Een mogelijke verklaring voor de gemiddeld lagere PHA-activiteit van tonsillaire lymfocytenkweken zou het "ontbreken" van de A.C.-fractie in een tonsillaire lymfocytensuspensie kunnen zijn (zie tabel 1). Voor de PHA-respons van tonsillaire lymfocyten maakte het dan ook nauwelijks enig verschil of ze wel of niet werden gezuiverd via een kolom. Van een schadelijk effect op de lymfocyten door de zuiveringsprocedure lijkt dan ook geen sprake te zijn.

Tonsillaire lymfocytensuspensies bleken vaak verontreinigd te zijn met schimmels en/of bacteriën. Als gevolg van de in de tonsil vaak voorkomende ontstekingsreactie lag de gemiddelde "Background" stimulatie in kweken van tonsillaire lymfocyten aanzienlijk hoger dan die in kweken van perifere lymfocyten (zie ook Oettgen et al., 1969). Bovenstaande overwegingen deden ons dan ook besluiten van het gebruik van tonsillaire lymfocyten, behoudens enkele uitzonderingen, af te zien.

\* Verklaring Per experiment -d.w.z. per kweek van de leukocyten van één donor- werd de te onderzoeken variabele onderzocht ten opzichte van de standaardkondities.

### 3.4. Onderzoek naar reproduceerbaarheid van de bepaling der DNA-synthese

#### 3.4.1. Inleiding

Uitgaande van de procedure zoals beschreven door Caron et al (1965) bleek bij aanvang van ons onderzoek de gemiddelde spreiding tussen een 6- tot 9-tal identieke buizen ongeveer  $25\% \pm 5\%$  (gemiddelde variatiecoëfficiënt) te zijn. Door een systematische analyse van alle fasen in een experiment vanaf het invullen der leukocyten suspensie in de kweekbuizen tot en met het overbrengen van de, in scintillatievloeistof opgeloste, DNA-extrakten in telpotjes, kon de voornaamste bron van deze hoge spreiding worden opgespoord en door het aanbrengen van enkele modificaties in de procedure worden teruggebracht tot ongeveer de helft.

#### 3.4.2. Analyse der spreidingsoorzaken

Om na te gaan in welke fase van het experiment de eventueel aanwezige, voornaamste foutenbron ligt, werd de inhoud van de aanvankelijk gescheiden opgezette buizen op verschillende tijdstippen tijdens het experiment weer verzameld en opnieuw uitgevuld. Aan de hand van dergelijke experimenten kon worden vastgesteld dat de voornaamste spreidingsbron lag tijdens de inkubatieperiode der kweken bij  $36^{\circ}\text{C}$  in de  $5\% \text{CO}_2$ -stoof. Wij opperden de mogelijkheid dat een rigoureuze reinigingsprocedure van de te gebruiken kweekbuizen de spreiding zou kunnen verminderen, hetgeen ook inderdaad het geval bleek te zijn. Bovendien werd door deze behandeling van de kweekbuizen de gemiddelde activiteit per buis hoger.

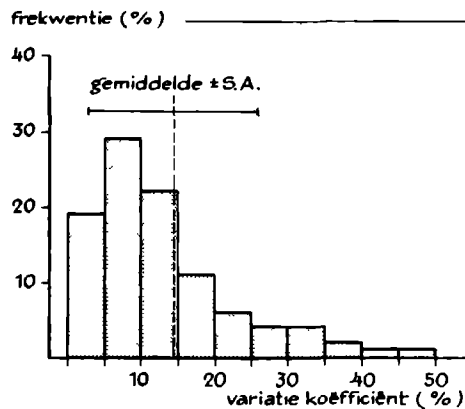
In de uiteindelijke vastgestelde procedure kon de spreiding worden gereduceerd tot gemiddeld  $12\% \pm 4\%$  voor series van een negental identieke buizen.

De spreidingen, uitgedrukt in variatiecoëfficiënten, zoals ze gedurende alle uitgevoerde experimenten voorkwamen in triplo-buizen -het aantal dat door ons voor de DNA-synthese bepaling werd gebruikt-, zijn weergegeven in het frequentie histogram in figuur 3. De gemiddelde spreiding is  $14,4\% \pm 11,4\%$ .<sup>\*</sup> Van het aantal waarnemingen heeft 69% een spreiding van  $\leq 15\%$ , 80% een spreiding van  $\leq 20\%$  en 87% een spreiding van  $\leq 25\%$ . Resultaten met een spreiding groter dan 25% werden meestal niet gebruikt.

De scintillatieteller werd afgesteld op telling van minimaal 10.000 cpm per monster, zodat de tellingen met een onnauwkeurigheid van ongeveer 1% plaatsvonden.

#### 3.4.3. Telrendement

Met behulp van een interne  $^3\text{H}$ -tolueen standaard kon worden berekend dat de gemiddelde efficiency  $35\% \pm 2,3\%$  bedroeg. De spreiding in het telrendement -gemeten met behulp van een externe standaard- tussen de verschillende samples van een experiment was nooit groter dan ongeveer 2% en gemiddeld ongeveer 1%.



Figuur 3. Frekwentie-Histogram van de variatiekoëfficiënten van 500 triplo bepalingen der DNA-synthese van met PHA gestimuleerde lymfocyten.

\* Gemiddelde variatiekoëfficiënt  $\pm$  de standaardafwijking.



### 3. 5. Onderzoek naar nauwkeurigheid en gevoeligheid der plaque-techniek

Uitgaande van de plaque-telmethode, zoals die werd ontwikkeld door Dulbecco et al. (1954), werd een aantal variabelen, die de nauwkeurigheid en gevoeligheid van deze virustitratiemethode bepalen, onderzocht, zoals adsorptietijd, volume en concentratie van het te enten inokulum, effect van wassen der monolayers na virusadsorptie, verloop van de plaque-ontwikkeling en de gevoeligheid van een aantal cellijnen. De resultaten worden kort samengevat.

Indien de plaque-toename, geteld op verschillende tijdstippen na het beënden der monolayers met de betreffende virusverduunningen (zie Materiaal en Methoden, 2. 7.) wordt uitgezet tegen de tijd, valt vanaf 24 tot 48 uur de grootste plaque-toename waar te nemen, terwijl na 72 uur het aantal plaques nagenoeg konstant blijft.

Eveneens bleek, dat bij een te hoge virusconcentratie in het te enten inokulum het aantal plaques per schaalpje na 48 uur reeds zo hoog was, dat een verdere toename van het aantal plaques niet meer te tellen was door het optreden van elkaar overlappende plaques (konfluentie).

Bij een kumulatieve telling, waarbij de plaques twee maal, na 48 en 72 uur, werden geteld en ze met een viltstift permanent werden gemarkeerd (volgens Berg et al., 1963), is de relatie tussen het aantal verwachte en het aantal waargenomen plaques per schaalpje lineair tot ongeveer 100 PFU, mits men althans enige "telervaring" heeft (zie figuur 4). Hieruit volgt dat de virusconcentratie niet te hoog mag zijn; de concentratie mag echter ook niet te laag zijn vanwege de dan optredende, hoge, spreiding tussen de schaalpjes.

Voor onze virustitraties besloten wij per te titreren monster twee opeenvolgende, 10-voudige, verduunningen te titreren en schaalpjes waarin minder dan 10 of meer dan 100 plaques aanwezig zijn, voor de berekening der virustiter uit te sluiten.

Met inacht nemen van bovenstaande overwegingen lag de gemiddelde spreiding tussen triplo-schaalpjes (uitgedrukt als gemiddelde variatiecoëfficiënt) van  $20\% \pm 16\%$  (bij 10 à 20 plaques per schaalpje) tot  $8\% \pm 6\%$  (bij 75 à 100 plaques per schaalpje).

Valle (1971) wees erop dat er een optimaal entvolume bestaat voor V. S. V.

Voor poliovirus werd door ons een dergelijk optimum niet gevonden.

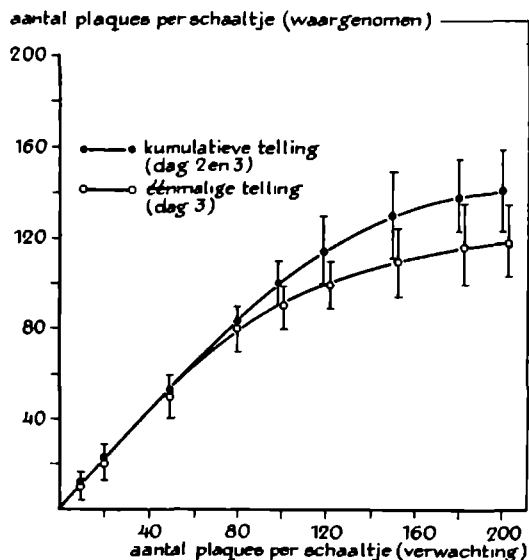
De keuze van de adsorptietijd van het virus aan de cellen der monolayer kan arbitrair zijn, daar het aantal plaques niet toeneemt ten gevolge van verlenging der adsorptieperiode (na 30 minuten) onafhankelijk van de concentratie van het inokulum. Hieruit valt af te leiden dat, zelfs na het opbrengen van de immobiliserende agarlaag, het adsorptieproces waarschijnlijk, wellicht vertraagd, doorgaat, doordat het kleine poliovirion door de agar diffundeert en dan alsnog de monolayer bereikt, een verschijnsel dat reeds Younger (1956) opmerkte.

Wegwassen van niet-geadsorbeerd virus gaf een reductie van ongeveer 50% van de plaque-opbrengst, hetgeen met bovenstaande in overeenstemming is.

BSC-1 bleek de minst gevoelige -de plaque-opbrengst is laag en de plaqueontwikkeling vertraagd-, HeLa de meest gevoelige cellijn te zijn, terwijl de Vero-celijn een intermediaire positie innam.

Op basis van praktische overwegingen, zoals handzaamheid der cellijn, kozen wij voor onze titraties de Vero-celijn, temeer daar de snelle plaque-ontwikkeling in HeLa cellen ons nauwelijks tijd liet voor een kumulative telling.

Het dient vermeden te worden verschillende cellijnen door elkaar te gebruiken voor de titraties.



Figuur 4. Konfluentieverschijnsel tijdens de plaque-vorming door poliovirus. Schaaltes, in triplo, werden beënt met 0,2 ml van een virusverduunning uit een reeks met oplopende titer. De, tijdens inkubatie bij 36° C gevormde, plaques werden bij de kumulative telling na de 2de en de 3de dag geteld, waarbij de plaques op de 2de dag permanent werden gemarkeerd met een viltstift. Bij de éénmalige telling werden dezelfde schaaltes, na verwijdering van de markering, geteld op de 3de dag. Weergegeven zijn de gemiddelden  $\pm$  standaardafwijking van het aantal plaques per serie triplo schaaltes.

#### Hoofdstuk 4. Onderzoek naar de door poliovirus geïnduceerde remming van de DNA-synthese van de met PHA gestimuleerde lymfocyt

##### 4.1. Inleiding

Het doel van dit onderzoek was het mechanisme te bestuderen op welke wijze poliovirus de DNA-synthese van gestimuleerde lymfocyten remt, zoals door Willems et al.(1969c) werd aangetoond. In hun artikel beschreven zij dat poliovirus met een M. O. I. van 5 PFU/cel of groter, steeds een DNA-synthese-inhibitie induceerde van 50% of groter. Met een M. O. I. van 25 PFU/cel kregen zij zelfs remmingen groter dan 90%.

Op grond van het feit dat deze afname van de DNA-synthese niet het gevolg kon zijn van een afname van het cel aantal door een CPE en van het feit dat het onmogelijk bleek in meer dan maximaal 20% der cellen infectieus virus aan te tonen, postuleerden zij het bestaan van een abortieve infectie van de lymfocyt door poliovirus het virus penetreert in de cel doch is niet in staat zich te repliceren. Deze abortief geïnfecteerde cellen zouden niet in staat zijn tot een normale reactie op PHA, een verschijnsel dat o.a. ook voor rubellavirus, zowel na een infectie in vivo als in vitro, werd gevonden (Olson et al., 1968).

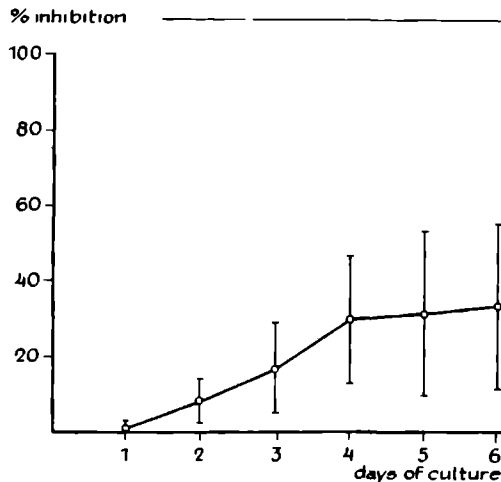
Zoals uit de resultaten zal blijken, waren wij niet in staat de waarnemingen van Willems et al.(1969c) te reproduceren. Wij vonden weliswaar een door poliovirus geïnduceerde remming der DNA-synthese van de gestimuleerde lymfocyt, doch deze remming was niet consistent groter dan 50%.

Daar de mogelijkheid niet werd uitgesloten dat deze diskrepantie het gevolg was van de door ons geoptimaliseerde en ten dele gemodificeerde cultuurkondities (zie hoofdstuk 3), werd een systematische analyse verricht naar al die variabelen welke van invloed zouden kunnen zijn op het gevonden resultaat.

##### 4.2. Resultaten

###### 4.2.1. Effect van poliovirus op de DNA-synthese van met PHA gestimuleerde, ongezuiverde, perifere lymfocyten

Figuur 5 toont de virus-geïnduceerde remming van de DNA-synthese van met PHA gestimuleerde, ongezuiverde lymfocyten gedurende de incubatieperiode ( $n = 6$ ). De kweken werden onmiddellijk na bereiding met een M. O. I. van 5 PFU/cel beënt en na een adsorptieperiode van 1 uur met PHA gestimuleerd, zoals beschreven is onder Materiaal en Methoden. Uit deze figuur valt af te lezen dat tot de 4de dag na stimulatie met PHA (waarop eveneens de maximale PHA-respons valt, zie hoofdstuk 3) de remming der DNA-synthese toeneemt tot onge-



Figuur 5. Door poliovirus geïnduceerde remming der DNA-synthese van met PHA gestimuleerde, ongezuiverde, perifere lymfocyten tijdens de kweekperiode.

$$\text{Remming (\%)} = 100\% - \left( \frac{\text{cpm/buis, + PHA + V}}{\text{cpm/buis, + PHA - V}} \times 100\% \right)$$

Weergegeven zijn de gemiddelden  $\pm$  standaardafwijking van 6 experimenten, waarin het remmingspercentage dagelijks werd bepaald (labeling 5 uur met  $1 \mu\text{Ci/buis } ^3\text{H-TdR}$ , Spec. Akt.  $5 \text{ Ci/mmol}$ ).

De kweken werden onmiddellijk na bereiding met  $5 \text{ PFU/cel}$  beënt en na 1 uur virusadsorptie met PHA gestimuleerd.

Kontrôlekweken bevatten geen virus.

veer 30%, terwijl de toename-snelheid na de 4de dag afneemt.

Dat de remming na de 4de dag nauwelijks nog toeneemt, werd eveneens bevestigd door de uitkomsten van alle proeven die gedaan zijn, in beschouwing te nemen. Het blijkt dan dat de gemiddelde remming op de 4de dag in 43 experimenten  $32\% \pm 17\%$  bedraagt, terwijl de gemiddelde remming op de 5de dag in 59, onafhankelijke, experimenten  $33\% \pm 21\%$  bedraagt. Figuur 6 toont het frequentie histogram van alle waargenomen remmingen op de 4de, 5de en 6de dag ( $n = 107$ ). De gemiddelde remming bedraagt  $33\% \pm 21\%$  (t-toets,  $p \ll 0,1\%$ ). Het 95% betrouwbaarheidsinterval bedraagt  $33\% \pm 4\%$ . Uit de frequentieverdeling blijkt dat 81% van het totale aantal experimenten een remming geeft die kleiner is dan 50%

De experimenten strekten zich uit over een periode van twee en een half jaar en betroffen in totaal een twintigtal donors.

#### 4.2.2. Effect van poliovirus op de DNA-synthese van met PHA gestimuleerde, gezuiverde, perifere lymfocyten en tonsillaire lymfocyten

Het effect van poliovirus op de DNA-synthese werd eveneens onderzocht in kweken van gezuiverde perifere lymfocyten en van tonsillaire lymfocyten. De gemiddelde remming van de DNA-synthese van met PHA gestimuleerde, gezuiverde, perifere lymfocyten bedraagt  $10\% \pm 22\%$  ( $n = 21$ ) (t-toets,  $p \approx 5\%$ ). Het 95% betrouwbaarheidsinterval bedraagt  $10\% \pm 10\%$ .

In 10 experimenten met gepaarde waarneming werd getoetst of de remming van de DNA-synthese van ongezuiverde en gezuiverde perifere lymfocyten significant van elkaar verschilde. Het gemiddelde verschil bedraagt  $27\% \pm 28\%$  (t-toets,  $p < 2\%$ ).

De gemiddelde remming in 17 tonsillaire met PHA gestimuleerde lymfocytenkweken bedraagt  $13\% \pm 27\%$  (t-toets,  $p > 10\%$ ). Het 95% betrouwbaarheidsinterval bedraagt  $13\% \pm 14\%$ .

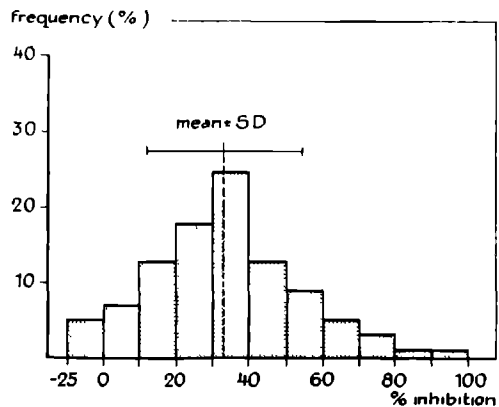
Er bestaat geen significant verschil tussen gezuiverde en ongezuiverde tonsillaire lymfocyten (gemiddelde verschil van 7 experimenten met gepaarde waarneming  $1\% \pm 4\%$  (t-toets,  $p > 50\%$ )).

Het verschil tussen tonsillaire lymfocyten en ongezuiverde perifere lymfocyten is zeer significant (t-toets,  $p \ll 0,1\%$ ), (t-toets voor 2 steekproeven).

#### 4.3 Konklusies

In tegenstelling met de bevindingen van Willems et al. (1969c) vonden wij slechts in een klein aantal experimenten (19%) een door poliovirus geïnduceerde remming van de DNA-synthese van 50% of groter. De gemiddelde remming in ongezuiverde

\* Gemiddeld remmingspercentage  $\pm$  de standaardafwijking.



**Figuur 6.** Frekwentie-Histogram van alle remmingspercentages gevonden op de 4de, 5de of 6de dag na stimulatie met PHA in kweken van ongezuiverde lymfocyten ( $n = 107$ ).  
Remmingspercentage: Zie toelichting figuur 5.

perifere lymfocyten ( $33\% \pm 21\%$ ) bleek significant groter te zijn dan die in gezuiverde perifere lymfocyten ( $10\% \pm 22\%$ ) en in tonsillaire lymfocyten ( $13\% \pm 27\%$ ).

#### 4.4 Analyse van de remming der DNA-synthese

##### 4.4.1. Effekt der cultuurkondities op de remming

De mogelijkheid was niet uitgesloten dat de in paragraaf 4.2. beschreven discrepantie tussen onze resultaten en die van Willems et al (1969c) werd veroorzaakt door de door ons partieel gemodificeerde cultuurkondities.

De beide experimentele systemen werden daarom nauwkeurig met elkaar vergeleken en elke variabele werd in minimaal 3 experimenten met gepaarde waarneming onderzocht op zijn effect op de remming der DNA-synthese.

Door een systematische analyse van deze factoren hoopten wij eveneens een aanknopingspunt te verkrijgen voor een onderzoek naar het mechanisme van de door poliovirus geïnduceerde remming.

- De volgende factoren werden onderzocht

- a) Gebruik van wel en niet gesiliconeerd glaswerk
- b) Wel en geen cry-sedimentatie met dextraan
- c) Wel en geen hemolyse met  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -oplossing
- d) Wel en geen preïnkubatie van het groeimedium
- e) Mediumsamenstelling - TC-medium 199 of Minimal Essential Medium  
- nuchter of foetaal kalfsserum
- f) Serumconcentratie 10% of 20% kalfsserum
- g) PHA-koncentratie 0,5% of 1,0% PHA (v/v %)
- h) Celconcentratie 0,5 of  $1,0 \times 10^6$  cellen/ml
- i) Multiplicity of Infection (M. O. I.) poliovirus 1 of 10 PFU/cel

Geen der onderzochte factoren vormde een verklaring voor de gevonden discrepantie (zie tabel 3). Hierbij dient te worden opgemerkt dat in de experimenten waarin de invloed van het serumtype werd onderzocht, de remmingspercentages bij gebruik van foetaal KAS slechts iets hoger lagen (gemiddeld  $32\% \pm 8\%$ ) dan bij gebruik van nuchter KAS (gemiddeld  $28\% \pm 9\%$ ). Het gemiddelde remmingspercentage van het totale aantal experimenten dat wij, later tijdens ons onderzoek, om redenen welke in hoofdstuk 3 werden beschreven, met foetaal kalfsserum uitvoerden, bedroeg echter  $44\% \pm 22\%$ , ( $n = 40$ ). Ook nu bleken de remmingspercentages dus niet consistent groter dan 50%.

De invloed van het foetaal kalfsserum leek afhankelijk te zijn van de serumbatch en verdient nader onderzoek.

- Er bestonden geen verschillen tussen de verschillende in apeniercellen gepas-

Tabel 3. Invloed van de cultuurkondities op de remming der DNA-synthese van ongezuiverde, perifere lymfocyten.

Variabelen	Remming (%) <sup>1)</sup> gem. $\pm$ S.A	p <sup>2)</sup> (t-toets)
a) Gesiliconeerd glaswerk + -	15% $\pm$ 17% 35% $\pm$ 17%	< 5%
b) Dextraan 5% + -	36% $\pm$ 8% 47% $\pm$ 14%	ns
c) NH <sub>4</sub> Cl-behandeling + -	27% $\pm$ 12% 28% $\pm$ 10%	ns
d) Prefnkubatie van het medium + -	34% $\pm$ 16% 27% $\pm$ 13%	ns
e) Samenstelling medium Med. 199 + 20% nKAS Med. 199 + 20% fKAS MEM + 20% nKAS MEM + 20% fKAS	28% $\pm$ 9% 32% $\pm$ 8% 33% $\pm$ 6% 33% $\pm$ 14%	ns
f) Serumconcentratie 10% 20%	50% $\pm$ 16% 40% $\pm$ 11%	ns
g) PHA-koncentratie 0,5% 1,0%	32% $\pm$ 22% 47% $\pm$ 22%	ns
h) Celconcentratie 0,5 $\times 10^6$ 1,0	28% $\pm$ 3% 30% $\pm$ 11%	ns
i) M.O.I. 1 PFU/cel 10 PFU/cel	30% $\pm$ 16% 32% $\pm$ 18%	ns
j) Virusinokulum No. 23 (PAN) No. 24 (PAN) No. 27 (PAN) No. 25 (Vero)	32% $\pm$ 17% 35% $\pm$ 3% 38% $\pm$ 5% 78% $\pm$ 17%	} ns < 5%
k) Labelingskondities Spec. Akt. 5 Ci/mmol 0.5 Ci/mmol	49% $\pm$ 3% 49% $\pm$ 5%	ns
Labelingstijden 5 uur 8 uur 24 uur	37% $\pm$ 12% 32% $\pm$ 16% 33% $\pm$ 13%	ns
l) Methode Willems Onze methode	43% $\pm$ 21% 37% $\pm$ 13%	ns

Weergegeven zijn gemiddelen  $\pm$  standaardafwijking van minimaal 3 experimenten.

Uitgangskondities: - gesiliconeerd glaswerk, + Dextraan 5%, - NH<sub>4</sub>Cl-behandeling, + prefnkubatie van het medium, Medium 199, 20% nKAS, 0,5% PHA,  $1 \times 10^6$  cellen/ml, 2 ml celsuspensie per buis, 10 PFU/cel poliovirus.

Labeling: gedurende 5 uur met  $1 \mu\text{Ci}$ /buis <sup>3</sup>H-TdR (Spec. Akt. 5 Ci/mmol).

1) Remmingspercentage: zie toelichting figuur 5.

2) Getoetst of betreffende remmingspercentages significant van elkaar afwijken.



seerde virusinokula, afgezien van het inokulum dat in Vero-cellen was gepasseerd (gemiddelde remming  $78\% \pm 17\%$ ) (tabel 3). Dit inokulum bleek echter besmet te zijn met mycoplasma. Het is bekend dat mycoplasma de PHA-respons onderdrukt (Simberkoff et al., 1969). Dit inokulum werd niet meer gebruikt.

- Ook de labelingscondities werden op hun effect op de door virus geïnduceerde DNA-synthese-inhibitie onderzocht. Er bestonden geen significante verschillen tussen de remmingspercentages bij gebruik van de specifieke activiteiten 5 Ci/mmol en 0,5 Ci/mmol noch bij gebruik van de verschillende labelings tijden 5, 8 en 24 uur (tabel 3). In een drietal experimenten waarin de methode van Willems et al (1969) werd vergeleken met de door ons gemodificeerde methode werden geen significante verschillen waargenomen (tabel 3).

- Vervolgens onderzochten wij of de DNA-synthese-remming afhankelijk was van de lymfocyten-donor. Bij dit onderzoek werd eveneens de humorale immunstatus van de donor betrokken. Er werden geen significante verschillen tussen de donoren gevonden en er bleek geen correlatie te bestaan met de specifieke antilichaamtiter (tabel 4).

#### 4.4.2 Invloed der virulentie van de poliovirusstammen op de DNA-syntheseremming

Daar het niet uitgesloten werd geacht dat de mate der DNA-syntheseremming bepaald werd door de virulentie (zoals voor rubellavirus beschreven door Savel et al., 1970) en/of type van de poliovirusstam, onderzochten wij of de DNA-syntheseremming afhankelijk was van de gebruikte virusstam.

Wij onderzochten de virulente prototype- en de avirulente vaccin-stammen van type 1, 2 en 3 en daarnaast stammen die geïsoleerd waren uit faeces of rioolwater. Met elke stam werden minimaal drie experimenten met gepaarde waarneming verricht (M. O. I. 10 PFU/cel). Er werden geen significant verschillen in de DNA-syntheseremming gevonden (tabel 5).

#### 4.4.3. Invloed van virusinaktivatie op de DNA-syntheseremming

Voor de remming der DNA-synthese is infectieus poliovirus noodzakelijk. Het effect van infectieus poliovirus ( $1 \times 10^8$  PFU/ml) werd in 47 experimenten vergeleken met UV-geïnactiveerd virus ( $\leq 10$  PFU/ml).

De gemiddelde remming door geïnactiveerd virus bedroeg  $4\% \pm 20\%$ , die door infectieus virus  $29\% \pm 18\%$ . Het verschil is significant (t-toets,  $p \ll 0,1\%$ ).

Een niet virale cytotoxische faktor in de virusinokula lijkt dus niet verantwoordelijk voor de remming der DNA-synthese.

Tabel 4. Relatie remmingspercentage en donor

DONOR	1	2	3	4	5 <sup>1)</sup>	6	7
Ab-titer	1000	1000	< 10	100	5000	100	500
Remming (%) <sup>2)</sup> Gem. $\pm$ S. A.	30% $\pm$ 15%	25% $\pm$ 12%	36% $\pm$ 19%	38% $\pm$ 10%	23% $\pm$ 22%	20% $\pm$ 48%	30% $\pm$ 29%

Weergegeven zijn de gemiddelde remmingspercentages  $\pm$  standaardafwijking die tijdens het onderzoek voor verschillende donors werden gevonden (minimaal 5 experimenten per donor).

1) Donor 5 is de donor, wiens lymfocyten door Willems et al. (1969c) werden gebruikt.

2) Remming (%): zie toelichting figuur 5.

Tabel 5. Invloed der virulentie van poliovirus op de remming der DNA-synthese (n = 3)

Virusstam	Virulentie <sup>1)</sup>	Remming (%) <sup>2)</sup> gem. $\pm$ S. A.		p <sup>3)</sup> (t-toets)
Kontrolestam type 1	-	47% $\pm$ 14%	36% $\pm$ 8%	
Prototype (Mahoney) type 1	+	52% $\pm$ 3%		ns
Vaccinstam (Sabin) type 1	-		31% $\pm$ 10%	ns
Faecesisolaat type 1	+		24% $\pm$ 6%	ns
Rioolwaterisolaat type 1	-	37% $\pm$ 12%		ns

1) Volgens Verlinde et al., 1970.

2) Remming (%): zie toelichting figuur 5.

3) Getoetst of remming door betreffende stam significant afwijkt van remming door kontrôlestam.

#### 4 4.4. Effect van poliovirus op de vitaliteit der kweken

De waargenomen DNA-synthese-remming kan niet worden verklaard door een grotere celsterfte in de geïnfecteerde kweken als gevolg van CPE. In een 75-tal experimenten met gepaarde waarneming was het gemiddelde verschil tussen de celconcentraties op de 5de dag in geïnfecteerde en niet geïnfecteerde kweken:  $0,1 \times 10^6 \pm 34\%$  cellen/ml. (tekentoets ns)

#### 4 4.5. Analyse van mogelijke korrelaties

Wij hebben onderzocht of er een verband bestond tussen de mate van de door PHA geïnduceerde DNA-synthese activiteit en de mate van DNA-synthese-remming door poliovirus. Er werd geen verband gevonden. Evenmin bleek de mate der DNA-synthese-remming gekorreleerd met de grootte der virusproductie in ongezuiverde lymfocytenkweken.

#### 4 4 6. Effect van poliovirus op niet gestimuleerde lymfocytenkweken

In een 40-tal experimenten werd een onderzoek gedaan naar het effect van poliovirus op de 'background' DNA-synthese-activiteit van niet gestimuleerde, ongezuiverde lymfocytenkweken. In 16 experimenten werd de DNA-synthese gestimuleerd, in 24 experimenten geremd. Het gemiddelde van alle experimenten geeft een niet significante stimulatie van  $3\% \pm 60\%$  (t-toets,  $p > 50\%$ ).

Deze gegevens zouden er op kunnen wijzen dat in niet door PHA gestimuleerde kweken (en waarschijnlijk ook in gestimuleerde kweken) van ongezuiverde lymfocyten er zowel een stimulerend als een remmend mechanisme werkzaam is waardoor het uiteindelijke resultaat bepaald wordt. Immers, het virus werkt ook als antigeen, waardoor een specifieke stimulatie van gesensibiliseerde lymfocyten zou kunnen optreden (Pearmain et al., 1963, Elves et al., 1963). Dit laatste werd bevestigd in die experimenten waarin het effect van geïnactiveerd poliovirus op niet met PHA gestimuleerde lymfocytenkweken werd onderzocht ter bepaling van de mate van "cellulaire immuniteit" van de donor. In alle onderzochte gevallen (6) werd een stimulatie (gemiddeld ongeveer 150%) der DNA-synthese waargenomen.

#### 4.4.7. Effect van toevoegen van virus op verschillende tijdstippen na PHA-stimulatie

Om na te gaan tot welk moment in de ontwikkeling der PHA-respons, poliovirus nog in staat is de DNA-synthese te remmen, werden kweken van ongezuiverde gestimuleerde lymfocyten op opeenvolgende dagen tot en met de 5de dag na PHA stimulatie, beënt met 10 PFU poliovirus per cel.

De DNA-synthese werd op de 5de dag na het inzetten der kweken bepaald. De resultaten van 3 experimenten zijn samengevat in tabel 6. Poliovirus blijkt tot op de

Tabel 6 Invloed van het tijdstip van virusenting op de remming der DNA-synthese (n = 3)

+ PHA 0,5% (v/v)	+ Virus 10 PFU/cel	Remming (%) <sup>1)</sup> gem $\pm$ S.A.	p <sup>2)</sup> (t-toets)
dag 0	dag 0	32% $\pm$ 9%	< 5%
dag 0	dag 1	34% $\pm$ 10%	< 5%
dag 0	dag 2	35% $\pm$ 6%	< 5%
dag 0	dag 3	22% $\pm$ 11%	< 5%
dag 0	dag 4	12% $\pm$ 11%	ns
dag 0	dag 5	2% $\pm$ 2%	ns

<sup>1)</sup> Remming (%) zie toelichting figuur 5.

Bepaald op de 5de dag na PHA-stimulatie.

<sup>2)</sup> Getoetst of betreffende remming significant is.

3de dag na PHA stimulatie in staat te zijn de DNA-synthese significant (t-toets,  $p < 5\%$ ) te remmen. Toevoegen van poliovirus op de 5de dag heeft nauwelijks nog enig effect op de DNA-synthese.

#### 4.4.8. Effect van de Multiplicity of Infection (M. O. I.)

Het effect van verschillende, afnemende concentraties poliovirus (uitgedrukt als infectieuze eenheden (PFU) per cel) op de DNA-synthese van met PHA gestimuleerde lymfocyten is samengevat in tabel 7.

De gemiddelde remmingspercentages van 4 experimenten met gepaarde waarneming zijn weergegeven. Het blijkt dat bij een M. O. I. van  $10^{-4}$  de DNA-synthese van gestimuleerde lymfocyten niet significant (t-toets,  $p > 5\%$ ) meer wordt geremd.

#### 4.4.9. Invloed van guanidine op de remming door poliovirus

Guanidine is een specifieke remmer van de replicatie van poliovirus en heeft geen invloed op het cellulaire nucleïnezuurmetabolisme (Crowther et al., 1961). Terwijl guanidine wel de virusvermenigvuldiging remt, zou het geen invloed op de door poliovirus in HeLa-cellen geïnduceerde remming van de cellulaire RNA- en eiwitsynthese hebben (Bablanian et al., 1965), doch wel de door virus geïnduceerde remming der DNA-synthese voorkomen (Powers et al., 1969).

In tabel 8 zijn de resultaten van 5 experimenten samengevat. Onmiddellijk na beëindigen der kweken met poliovirus werd guanidine (Fluka) ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) toegevoegd. Zoals blijkt remt guanidine de virusproductie volledig, doch voorkomt niet de door virus geïnduceerde DNA-synthese-inhibitie.

#### 4.5. Interaktie tussen monocyten (makrofagen) en lymfocyten in de door virus geïnduceerde remming der DNA-synthese

Zoals uit de voorgaande resultaten bleek is de gemiddelde door poliovirus geïnduceerde remming van de door PHA geïnduceerde DNA-synthese van ongezuiverde lymfocyten significant groter dan de remming van de DNA-synthese van gezuiverde lymfocyten.

Hieruit zou men kunnen konkluderen dat monocyten en/of polymorfkernige leukocyten, die immers tijdens de zuiveringsprocedure worden verwijderd, noodzakelijk zijn voor de door virus geïnduceerde DNA-synthese-inhibitie.

Om deze hypothese te testen werden gezuiverde monocytenkweken bereid (zie Materiaal en Methoden) waaraan vervolgens gezuiverde, gestimuleerde en niet gestimuleerde lymfocyten werden toegevoegd ( $1 \times 10^6$  cellen per buis). Er werden

Tabel 7. Invloed der M.O.I. op de remming der DNA-synthese (n = 4)

M. O. I. PFU/cel	Remming (%) <sup>1)</sup> gem. $\pm$ S. A.	p <sup>2)</sup> (t-toets)
40	31% $\pm$ 15%	< 5%
20	36% $\pm$ 11%	< 5%
10	37% $\pm$ 17%	< 5%
1	38% $\pm$ 12%	< 5%
10 <sup>-1</sup>	37% $\pm$ 18%	< 5%
10 <sup>-2</sup>	28% $\pm$ 14%	< 5%
10 <sup>-3</sup>	20% $\pm$ 9%	< 5%
10 <sup>-4</sup>	9% $\pm$ 8%	ns
10 <sup>-5</sup>	2% $\pm$ 4%	ns
10 <sup>-6</sup>	2% $\pm$ 3%	ns

<sup>1)</sup> Remming (%): zie toelichting figuur 5.

<sup>2)</sup> Getoetst of betreffende remming significant is.

Tabel 8. Invloed van guanidine op de remming der DNA-synthese (n = 5)

+ PHA 0,5% (v/v)	Virus 10 PFU/cel	Guanidine 100 $\mu$ gr/ml	Virusproductie <sup>1)</sup> (d <sub>4</sub> )	Remming (%) <sup>2)</sup> gem. $\pm$ S. A.
+	-	-		0%
+	+	-	100%	46% $\pm$ 19%
+	-	+		5% $\pm$ 3%
+	+	+	0%	49% $\pm$ 21%

<sup>1)</sup> Maximale virusproductie op dag 4 = 100%.

<sup>2)</sup> Remming (%): zie toelichting figuur 5.

15 experimenten met gepaarde waarneming verricht. De gemiddelde remmingspercentages zijn weergegeven in tabel 9.

Tabel 9. DNA-synthese en virus-geïnduceerde remming in kweken van gezuiverde en niet gezuiverde lymfocyten, van gezuiverde monocyten en van met monocyten gereconstitueerde gezuiverde lymfocyten (n = 15)

Lymfocyten <sup>1)</sup> (gezuiverd)	Monocyten (gezuiverd)	PHA 0,5% (v/v)	Virus 10 PFU/cel	DNA-synthese <sup>2)</sup> cpm $\pm$ v.c.	Remming (%) <sup>3)</sup> gem. $\pm$ S.A.	p <sup>4)</sup> (t-toets)
-		-	-	1200 $\pm$ 133%		
-		+	-	34.10 <sup>3</sup> $\pm$ 108%		
-		+	+	18.10 <sup>3</sup> $\pm$ 111%	44% $\pm$ 24%	<0,1%
+		-	-	3200 $\pm$ 221%		
+		+	-	19.10 <sup>3</sup> $\pm$ 103%	(39% $\pm$ 29%)*	<0,1%
+		+	+	21.10 <sup>3</sup> $\pm$ 100%	-4% $\pm$ 37%	ns
	+	-	-	115 $\pm$ 41%		
	+	+	-	780 $\pm$ 124%		
	+	+	+	230 $\pm$ 124%		
+	+	-	-	1300 $\pm$ 129%		
+	+	+	-	34.10 <sup>3</sup> $\pm$ 110%		
+	+	+	+	17.10 <sup>3</sup> $\pm$ 97%	47% $\pm$ 25%	<0,1%

1)  $1 \times 10^6$  cellen per buis, gezuiverd: +, niet gezuiverd: -

2) Bepaald op de 4de dag na inzetten der kweken.

Gedurende 5 uur gelabeld met  $1 \mu\text{Ci/buis } ^3\text{H-TdR}$  (Spec. Akt. 5 Ci/mmol).

3) Remming (%): zie toelichting figuur 5.

4) Getoetst of betreffende remming significant is.

\* Verminderde PHA-respons in kweken van gezuiverde lymfocyten.

Men kan hieruit het volgende afleiden:

De sterk verminderde reactie van gezuiverde lymfocyten op PHA is na reconstitutie van de lymfocyten met monocyten weer normaal en komt overeen met de reactie van niet gezuiverde lymfocyten op PHA. De monocyt (makrofaag) blijkt dus noodzakelijk te zijn voor een optimale PHA-respons (zie eveneens hoofdstuk 3).

Dit celtype blijkt eveneens noodzakelijk te zijn voor de door virus geïnduceerde DNA-synthese-inhibitie. De remming welke in de gezuiverde lymfocytenkweken geheel achterwege blijft, is weer wel aanwezig in de gerekonstitueerde kweken waarin aan gezuiverde lymfocyten gezuiverde monocysten werden toegevoegd. Bij vergelijking van de DNA-synthese activiteiten -uitgedrukt in cpm per buis- valt het bovendien op dat de suboptimale reactie van gezuiverde lymfocyten, met of zonder virus, op PHA, nagenoeg gelijk is aan de reactie van ongezuiverde, met virus geïnfecteerde lymfocyten op PHA en ook nagenoeg gelijk is aan de reactie van gerekonstitueerde, met virus geïnfecteerde lymfocytenkweken op PHA. Deze waarneming geeft ons een mogelijke verklaring voor het mechanisme van de DNA-synthese-remming door poliovirus. In de discussie (hoofdstuk 6) zal dat nader worden uitgewerkt. Uit tabel 9 blijkt eveneens dat de monocyt (makrofaag) niet of nauwelijks aan de DNA-synthese activiteit bijdraagt. Verder mag men aannemen dat de gezuiverde monocystenkweken in slechts geringe mate zijn verontreinigd met lymfocyten, gezien de zeer lage DNA-synthese activiteit in de monocystenkweken waaraan PHA werd toegevoegd.

#### 4.6. Konklusies

De voornaamste konklusies uit dit hoofdstuk worden in het kort geresumeerd.

- a) De gemiddelde, door poliovirus geïnduceerde remming der DNA-synthese van met PHA gestimuleerde, ongezuiverde lymfocyten is significant groter (t-toets,  $p < 2\%$ ) dan die van gezuiverde lymfocyten.
- b) De op basis hiervan geopperde veronderstelling dat de monocyt (makrofaag) noodzakelijk zou zijn voor de DNA-synthese-inhibitie werd bevestigd in onze experimenten waarin gezuiverde lymfocyten werden gerekonstitueerd met gezuiverde monocysten. Dat de polymorfkernige leukocyten (PMN) een rol van betekenis zouden spelen lijkt daarom onwaarschijnlijk, temeer daar de PMN reeds na 48 uur volledig degenereren onder in vitro omstandigheden (zie ook Elves et al., 1962).
- c) Terwijl guanidine, dat de virusvermenigvuldiging volledig remt, de DNA-synthese-remming niet voorkomt en virusvermenigvuldiging dus niet noodzakelijk lijkt te zijn, is toch alleen infectieus virus in staat het effect op te roepen.
- d) Toevoegen van poliovirus vanaf de 4de dag na PHA stimulatie heeft geen significant invloed meer op de DNA-synthese, evenmin M. O. I. 's lager dan  $10^{-3}$ .
- e) Geen der variabelen van de door ons gemodificeerde cultuurkondities had een significant effect op de resultaten of vormde een verklaring voor de discrepantie tussen onze resultaten en die van Willems et al. (1969c).



## Hoofdstuk 5. Onderzoek naar de vermenigvuldiging van poliovirus in lymfocyten en monocyten

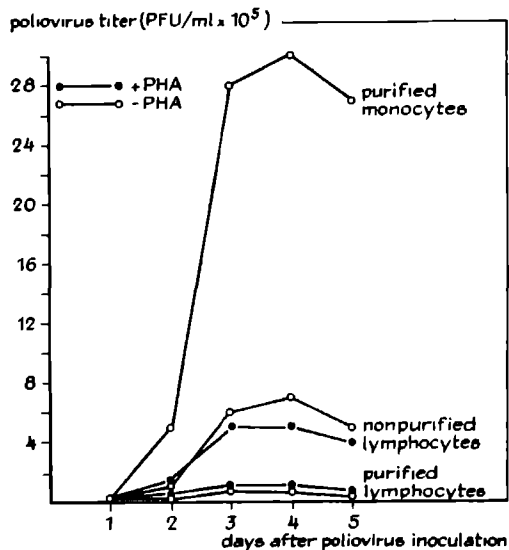
### 5.1. Inleiding

Zoals in het voorgaande hoofdstuk werd beschreven, waren wij niet in staat de bevindingen van Willems et al.(1969c)inzake de remming van de DNA-synthese van gestimuleerde lymfocyten door poliovirus te reproduceren.

De experimenten die in dit hoofdstuk worden beschreven, hebben tot doel na te gaan of in ons systeem ook het vermenigvuldigingspatroon van poliovirus in met PHA gestimuleerde en niet gestimuleerde lymfocyten zich onderscheidt van het patroon zoals dat door Willems et al (1969b) werd gevonden. Zij vonden dat de virusopbrengst in met PHA gestimuleerde, ongezuiverde lymfocytenkweken ongeveer 10 maal zo hoog was als in niet gestimuleerde lymfocytenkweken. De verhoogde virusreplikatie was het gevolg van een toename van het aantal virusproducerende cellen ("infective centers"), terwijl de virusopbrengst per cel voor gestimuleerde en niet gestimuleerde kweken hetzelfde was  $\pm 10$  PFU/cel. In overeenstemming met de gegevens van Edelman et al.(1968) voor VSV schreven zij deze toename toe aan het ontstaan van virus-gevoelige lymfoblasten -onder invloed van PHA- waaraan poliovirus efficiënter adsorbeerde, en waarin het efficiënter penetreerde en reliceerde. Daarentegen zouden niet gestimuleerde lymfocyten zeer ongevoelige gastcellen voor poliovirus zijn. Zoals zal blijken, stemmen onze resultaten inzake de virusreplikatie evenmin overeen met die van van Willems et al. Wij vonden geen verhoging van de virusreplikatie in met PHA gestimuleerde, ongezuiverde lymfocytenkweken. Veel eerder was er sprake van een lichte afname.

### 5.2 Resultaten

5.2.1. Vermenigvuldiging van poliovirus in kweken van ongezuiverde lymfocyten  
In figuur 7 wordt het verloop van de virusvermenigvuldiging in ongezuiverde lymfocytenkweken weergegeven. De kweken werden bereid zoals beschreven onder Materiaal en Methoden, vervolgens beënt met 1 PFU poliovirus per cel. Het niet geadsorbeerde virus werd de volgende dag door drie maal wassen verwijderd, waarna de buizen opnieuw werden voorzien van 1 ml vers medium. De controle-buizen ontvingen geen PHA. Op opeenvolgende dagen werden buizen van zowel gestimuleerde als niet gestimuleerde kweken ingevroren bij  $-20^{\circ}\text{C}$  en na beëindiging van het experiment getitreerd volgens de plaque-methode. Na het wassen bedraagt het gemiddelde celverlies ongeveer 50%. Om deze reden werden de cellen na het wassen niet in 2 ml maar in 1 ml vers medium geresuspendeerd. Deze



Figuur 7. Vermenigvuldiging van poliovirus in kweken van gezuiverde monocysten en van wel en niet met PHA gestimuleerde, gezuiverde en ongezuiverde lymfocyten.

Weergegeven zijn de gemiddelden van 21 experimenten met ongezuiverde lymfocyten, van 12 experimenten met gezuiverde lymfocyten en van 6 experimenten met gezuiverde monocysten, waarin de virusproductie dagelijks werd bepaald.

De kweken werden onmiddellijk na bereiding beënt met 1 PFU/cel poliovirus. Het niet geadsorbeerde virus werd na 20 uur weggewassen.

handwijze bleek geen invloed te hebben op de resultaten. De in de figuur weergegeven waarden stellen de gemiddelden voor van 21 experimenten waarin dagelijks de virusopbrengst werd bepaald. De virusproductie komt eerst na de tweede dag goed op gang en bereikt op de 3de à 4de dag een maximum. Hoewel de maximale virusproductie in niet gestimuleerde lymfocyten op dag 4 en in de gestimuleerde lymfocyten op dag 3 lijkt te liggen, zijn de verschillen tussen de virusopbrengsten op de 3de en de 4de dag niet significant (t-toets,  $p > 10\%$ ).

Indien niet anders vermeld is, werd voor onze experimenten daarom volstaan met de bepaling der virusopbrengst op de 4de dag. De gemiddelde, maximale virusproductie in ongezuiverde, niet gestimuleerde lymfocytenkweken bedraagt  $(650 \pm 750) \times 10^3$  PFU/ml (t-toets,  $p < 0,1\%$ ) ( $n = 64$ ). Het 95% betrouwbaarheidsinterval is  $(650 \pm 190) \times 10^3$  PFU/ml. Uit dit resultaat blijkt dat er een aanzienlijke variabiliteit bestaat tussen de verschillende experimenten met betrekking tot de virusvermenigvuldiging. Een nader onderzoek toonde aan dat de mate van virusproductie afhankelijk is van de donor.

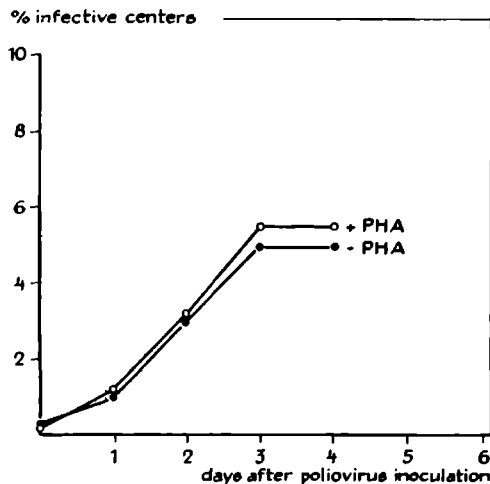
De gemiddelde, maximale virusproductie in met PHA gestimuleerde lymfocytenkweken bedraagt  $(530 \pm 690) \times 10^3$  PFU/ml (t-toets,  $p < 0,1\%$ ) ( $n = 64$ ), het 95% betrouwbaarheidsinterval  $(530 \pm 170) \times 10^3$  PFU/ml. Het verschil tussen de virusproductie in beide systemen is niet significant (t-toets,  $p > 10\%$ ).

In figuur 10 is de ontwikkeling van het aantal virus producerende cellen, als fractie van het totaal aantal cellen ("infective centers") en bepaald als beschreven onder 2.7.2., weergegeven voor zowel gestimuleerd als niet gestimuleerde, ongezuiverde lymfocytenkweken. De weergegeven waarden stellen de gemiddelden voor van 4 experimenten. Ook met betrekking tot het percentage "infective centers" blijkt er tussen beide typen van kweek geen significant verschil te bestaan (t-toets,  $p > 5\%$ ). Het gemiddelde percentage "infective centers" bedraagt in niet gestimuleerde kweken  $5\% \pm 4\%$ , in gestimuleerde kweken  $6\% \pm 5\%$ .

### 5.2.2 Effect van concentratie en tijdstip van toevoeging van PHA

Uit de voorgaande experimenten bleek dat stimulatie met PHA geen significante invloed heeft op de virusproductie in ongezuiverde lymfocytenkweken. Dit werd eveneens bevestigd door 3 experimenten waarin de invloed van de concentratie van PHA op de virusvermenigvuldiging werd onderzocht. Terwijl de concentratie van PHA aanzienlijke invloed had op de PHA-respons (zie hoofdstuk 3) was de virusopbrengst in kweken met respectievelijk 0,5%, 1,0% en 2,0% PHA vrijwel gelijk (tabel 10).

Ook toevoeging van PHA op verschillende dagen na de enting met virus (onderzocht in 3 experimenten) had geen significante invloed op het verloop van de



Figuur 8. Ontwikkeling der "infective centers" in met poliovirus beënte kweken van ongezuiverde lymfocyten gedurende de kweekperiode. Weergegeven zijn de gemiddelden van 4 experimenten.

Tabel 10. Invloed van de PHA concentratie op de virusproductie in kweken van ongezuiverde lymfocyten (n = 3)

PHA-koncentratie % (v/v)	DNA-synthese ( $d_4$ ) <sup>1)</sup> cpm $\pm$ v. c.	Virusproductie ( $d_4$ ) (PFU/ml), gem. $\pm$ v. c.	p <sup>2)</sup> (t-toets)
0	$1 \times 10^3 \pm 35\%$	$650 \times 10^3 \pm 61\%$	
0,5%	$120 \times 10^3 \pm 58\%$	$500 \times 10^3 \pm 59\%$	ns
1,0%	$110 \times 10^3 \pm 54\%$	$400 \times 10^3 \pm 57\%$	ns
2,0%	$50 \times 10^3 \pm 50\%$	$400 \times 10^3 \pm 62\%$	ns

1) DNA-synthese in niet met virus beënte controlekweken.

2) Getoetst of betreffende virusproductie afwijkt van de virusproductie in niet gestimuleerde (- PHA) kweken.

virusvermenigvuldiging (tabel 11).

Het feit dat PHA geen invloed heeft op de virusproductie in ongezuiverde lymfocytenkweken werd eveneens bevestigd door de bevinding dat in kweken waarin door een of andere oorzaak de PHA-respons minimaal was, de virusproductie, toch "normaal" was.

### 5.2.3. Effekt der cultuurkondities op de virusproductie

Dezelfde factoren die werden onderzocht op hun invloed op de remming van de DNA-synthese door poliovirus (paragraaf 4.4.1.) bleken ook op het door ons gevonden patroon der virusvermenigvuldiging geen significante invloed te hebben. Evenmin was het patroon der virusreplikatie veranderd in kweken waarin het niet geadsorbeerde virus onmiddellijk na de adsorptieperiode werd gewassen, met dien verstande dat het tijdstip der maximale virusproductie een dag vroeger leek te liggen (op dag 3).

### 5.2.4. Effekt van de celconcentratie

Hoewel het algemene patroon der virusvermenigvuldiging voor de onderzochte celconcentraties ( $0,5, 1, 0, 2, 0 \times 10^6$  cellen/ml) hetzelfde is, laat tabel 12 zien dat de virusopbrengst, zoals te verwachten is, lineair afhankelijk is van de celconcentratie ( $n = 3$ ). Er bleek een kritisch, minimaal cel aantal per buis ( $0,5 \times 10^6$  cellen) te bestaan waaronder nauwelijks nog virusproductie in de kweken kon worden aangetoond. Onze experimenten werden uitgevoerd met kweken van 2 ml celsuspensie met een concentratie van  $1 \times 10^6$  cellen per ml. Na het wassen voor de verwijdering van het niet geadsorbeerde virus - waarbij een gemiddeld verlies van ongeveer 50% optrad - werden de cellen geresuspendeerd in 1 ml medium, zodat de celconcentratie  $1 \times 10^6$  cellen/ml bleef.

### 5.2.5. Effekt van M.O.I.'s groter of gelijk dan 1 PFU/cel

In 3 experimenten met gepaarde waarneming werd de invloed van een M.O.I. van 1 en 10 PFU/cel op de virusvermenigvuldiging van ongezuiverde lymfocytenkweken bestudeerd. In één experiment met gepaarde waarneming werd eveneens een M.O.I. van 1 en 40 PFU/cel getest.

Het blijkt dat een M.O.I. van 1 PFU/cel reeds voldoende is om de voor virus gevoelige celpopulatie volledig te infekteren (tabel 13).

Een verhoging van de M.O.I. heeft geen effect op het virusvermenigvuldigingspatroon en de virusopbrengst. Het systeem is dus reeds verzadigd bij 1 PFU/cel. Indien niet anders vermeld, werd voor onze experimenten een M.O.I. van 1 PFU/cel gebruikt.

Tabel 11. Invloed van het tijdstip van PHA toevoeging op de virusproductie in kweken van ongezuiverde lymfocyten (n = 3)

PHA 0,5% (v/v)	DNA-synthese (d <sub>4</sub> ) <sup>1)</sup> cpm ± v. c.	Virusproductie (d <sub>4</sub> ) (PFU/ml), gem. ± v. c.	p <sup>2)</sup> (t-toets)
	600 ± 67%	920 x 10 <sup>3</sup> ± 62%	
dag 0	110 x 10 <sup>3</sup> ± 56%	900 x 10 <sup>3</sup> ± 60%	ns
dag 1	85 x 10 <sup>3</sup> ± 36%	680 x 10 <sup>3</sup> ± 63%	ns
dag 2	30 x 10 <sup>3</sup> ± 32%	750 x 10 <sup>3</sup> ± 58%	ns
dag 3	5 x 10 <sup>3</sup> ± 27%	900 x 10 <sup>3</sup> ± 64%	ns

1) DNA-synthese in niet met virus beënte controlekweken.

2) Getoetst of betreffende virusproductie significant afwijkt van de virusproductie in niet gestimuleerde (- PHA) kweken.

Tabel 12. Invloed van de celconcentratie op de virusproductie in kweken van met PHA gestimuleerde, ongezuiverde lymfocyten (n = 3)

Cel-koncentratie x 10 <sup>6</sup> /ml	DNA-synthese (d <sub>4</sub> ) <sup>1)</sup> cpm ± v. c.	Virusproductie (d <sub>4</sub> ) (PFU/ml), gem. ± v. c.
0,5	40 x 10 <sup>3</sup> ± 38%	300 x 10 <sup>3</sup> ± 37%
1,0	85 x 10 <sup>3</sup> ± 36%	750 x 10 <sup>3</sup> ± 53%
2,0	100 x 10 <sup>3</sup> ± 53%	1400 x 10 <sup>3</sup> ± 67%

1) DNA-synthese in niet beënte kweken.

Tabel 13. Invloed der M. O. I. op de virusproductie in kweken van ongezuiverde lymfocyten (n = 3)

M. O. I. PFU/cel	Virusproductie (d <sub>4</sub> ) (PFU/ml), gem. ± v. c.	p <sup>1)</sup> (t-toets)
1	600 x 10 <sup>3</sup> ± 80%	ns
10	500 x 10 <sup>3</sup> ± 82%	

1) Getoetst of betreffende virusopbrengsten significant van elkaar afwijken

#### 5.2.6 Effekt van M. O.I.'s kleiner dan 1 PFU/cel

Wij hebben vervolgens proeven gedaan met lagere M. O.I.'s

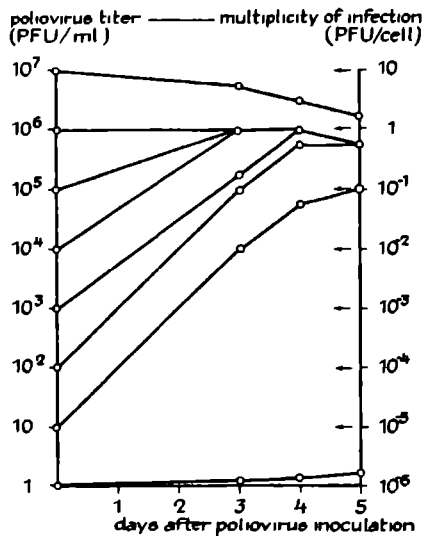
De kweken werden beënt met virus en na adsorptie niet gewassen, omdat wij aannamen dat het niet-geadsorbeerde virus de eventuele virusproductie niet zou maskeren.

In figuur 9 zijn de resultaten van 8 experimenten met gepaarde waarneming samengevat. Men kan hieruit afleiden dat bij een M. O.I. van  $10^{-1}$  en  $10^{-2}$  het systeem nog verzadigd is, doch dat dit niet meer het geval is bij een M. O.I. van  $10^{-3}$ . Weliswaar wordt -in het laatste geval- op de 4de dag de maximale virusproductie nog bereikt, doch op de derde dag is de virusopbrengst minder dan die bij hogere M. O.I.'s. Klaarblijkelijk was het systeem bij de aanvang van het experiment niet volledig verzadigd. De niet geïnfecteerde cellen worden echter, tijdens het experiment, alsnog door het geproduceerde virus, afkomstig uit de bij aanvang wel geïnfecteerde cellen, geïnfecteerd en op deze wijze wordt op de 4de dag toch een maximale virusopbrengst bereikt. Bij een M. O.I. van  $10^{-4}$  PFU/cel wordt echter zelfs op de 4de dag de maximale virusopbrengst niet meer bereikt.

#### 5.2.7. Vermenigvuldiging van poliovirus in kweken van gezuiverde lymfocyten

Uit de voorgaande resultaten bleek dat de door PHA geïnduceerde lymfoblasten geen extra bijdrage levert aan de virusvermenigvuldiging in ongezuiverde lymfocytenkweken. In de volgende experimenten wordt een poging ondernomen om het celtype dat verantwoordelijk is voor de virusreplikatie te identificeren. Daartoe werd het effect bestudeerd van een zuiveringsprocedure zoals beschreven onder Materiaal en Methoden, waardoor de fagocyterende celtypen polymorf-kernige leukocyten en monocyten, grotendeels uit de leukocyten suspensie worden verwijderd en waardoor we een gemiddeld  $\pm 95\%$  zuivere lymfocyten suspensie verkrijgen ( $\pm 5\%$  PMN en minder dan  $1\%$  monocyten).

Kweken van gezuiverde, gestimuleerde en niet gestimuleerde lymfocyten werden opgezet overeenkomstig de beschrijving onder Materiaal en Methoden en vervolgens beënt met 1 PFU/cel. De volgende dag werd het niet geadsorbeerde virus weggewassen. De gemiddelden van 12 experimenten waarin het patroon van de virusvermenigvuldiging dagelijks werd nagegaan zijn weergegeven in figuur 7 (p. 63). Het blijkt dat de virusproductie in gezuiverde lymfocytenkweken slechts gering is (ongeveer 10 maal lager dan die in ongezuiverde lymfocyten). De maximale virusproductie valt op de 3de à 4de dag na het inzetten van de kweken. Daarom werd voor de volgende experimenten volstaan met de bepaling van de virusproductie op de 4de dag. De gemiddelde, maximale virusproductie in niet gestimuleerde gezuiverde lymfocytenkweken bedraagt  $(54 \pm 73) \times 10^3$  PFU/ml (t-toets,  $p < 0,1\%$ ) ( $n = 47$ ). Het 95% betrouwbaarheidsinterval is  $(54 \pm 21) \times 10^3$  PFU/ml. De gemiddelde, maximale virusproductie in met PHA gestimuleerde, gezuiverde lymfocyten-



Figuur 9. Invloed der M. O. I. op het patroon der virusvermenigvuldiging in kweken van ongezuiverde, niet met PHA gestimuleerde lymfocyten. Weergegeven zijn de gemiddelden van 8 experimenten. De figuur werd geschematiseerd. De kurven voor met PHA gestimuleerde kweken werden weggelaten. Zij volgen hetzelfde patroon. De kweken werden onmiddellijk na bereiding beënt met poliovirus. Het niet geadsorbeerde virus werd niet weggewassen.



kweken bedraagt  $(78 \pm 69) \times 10^3$  PFU/ml (t-toets,  $p < 0,1\%$ ) ( $n = 47$ ), het 95% betrouwbaarheidsinterval is  $(78 \pm 20) \times 10^3$  PFU/ml.

Het verschil in virusproductie tussen de beide typen van kweek is niet significant (t-toets,  $p > 20\%$ ).

In 32 experimenten met gepaarde waarneming werd zowel de virusproductie in ongezuiverde als gezuiverde lymfocytenkweken bepaald. Het gemiddelde verschil tussen de maximale virusproductie in ongezuiverde lymfocytenkweken en gezuiverde lymfocytenkweken is significant (t-toets,  $p < 0,1\%$ ). Uit deze experimenten valt te konkluderen dat de kleine, niet gestimuleerde lymfocyt zeer waarschijnlijk niet verantwoordelijk is voor de virusvermenigvuldiging.

Evenmin lijken de eventueel in niet gestimuleerde kweken aanwezige lymfoblasten een wezenlijke bijdrage aan de virusreplikatie te leveren, daar in met PHA gestimuleerde lymfocytenkweken, waarin ongeveer 50 - 80% lymfoblasten aanwezig zijn, de virusvermenigvuldiging niet of nauwelijks toeneemt. Hoogstwaarschijnlijk is één van de, door de zuiveringsprocedure geëlimineerde celtypen verantwoordelijk voor de virusvermenigvuldiging. De geringe virusproductie in gezuiverde lymfocytenkweken zou kunnen worden toegeschreven aan de aanwezigheid van een residu van voor virus gevoelige cellen dat achterblijft na de zuiveringsprocedure. Deze indruk werd nog versterkt door de bevinding dat in kweken van lymfocyten, die gezuiverd werden over een niet gesiliconeerde kolom, waarmee de zuivering minder efficiënt is, ook de virusproductie relatief hoger is.

#### 5.2.8. Celtype verantwoordelijk voor de virusvermenigvuldiging

In 3 experimenten, uitgevoerd met partieel zuivere kweken van polymorfkernige leukocyten (PMN), welke waren samengesteld uit ongeveer 75% PMN en 25% lymfocyten, bleek geen virusgroei doch virusinaktivering plaats te vinden.

Uit bovenstaande gegevens wordt waarschijnlijk dat noch de lymfocyt, noch de polymorfkernige leukocyt, maar de monocyt de gastcel is waarin virusvermenigvuldiging plaats vindt.

Dit vermoeden wordt versterkt door het feit dat de verschillen in virusproductie tussen de verschillende donoren gekorreleerd leken te zijn met het percentage monocyten in het bloed van de donor. Bovendien vonden wij dat in ongezuiverde kweken het gemiddelde percentage "infective centers" ongeveer 5% en in gezuiverde kweken ongeveer 1% was. Deze percentages komen globaal overeen met de percentages monocyten in ongezuiverde en gezuiverde lymfocyten suspensies (zie 3.2.).

#### 5.2.9. Vermenigvuldiging van poliovirus in kweken van gezuiverde monocyten

Om de in de vorige paragraaf geopperde veronderstelling dat de monocyten de voornaamste rol zouden spelen in het vermenigvuldigingsproces van poliovirus te toetsen, werden, zoals beschreven onder Materiaal en Methoden, gezuiverde monocytenkweken bereid met behulp van de "glass-adherence" techniek. Het aantal cellen per buis lag tussen  $0,5 - 1,0 \times 10^6$  cellen. De kweken waren slechts in geringe mate "verontreinigd" met lymfocyten, zoals blijkt uit de geringe reactie op PHA van deze kweken (tabel 9) (p. 60).

De kweken werden geïnfecteerd met 1 PFU poliovirus per cel en de volgende dag drie maal gespoeld ter verwijdering van het niet geadsorbeerde virus. In figuur 7 is het vermenigvuldigingspatroon van poliovirus in monocytenkweken weergegeven. De waarden stellen de gemiddelden voor van 6 experimenten, waarin het verloop van de virusproductie dagelijks werd bepaald. Na de tweede dag is een aanzienlijke titerstijging waar te nemen. De maximale virusproductie valt op de 3de à 4de dag. In de volgende experimenten werd volstaan met de bepaling der virusopbrengst op de 4de dag.

De gemiddelde maximale virusproductie in monocytenkweken bedraagt  $(3200 \pm 2200) \times 10^3$  PFU/ml (t-toets,  $p < 0,1\%$ ) ( $n = 21$ ), het 95% betrouwbaarheidsinterval is  $(3200 \pm 980) \times 10^3$  PFU/ml. Het verschil in virusproductie tussen gezuiverde monocyten en gezuiverde lymfocyten is significant (t-toets,  $p < 0,1\%$ ) ( $n = 21$ ;  $m = 47$ ), (t-toets voor 2 steekproeven).

Afgezien van de kwantitatieve aspecten, komt het patroon der virusvermenigvuldiging in monocyten met dat in ongezuiverde lymfocyten overeen, een argument te meer om aan te nemen dat juist de monocyten in ongezuiverde kweken verantwoordelijk zijn voor de virusproductie.

Tabel 14 laat zien dat toevoeging van PHA aan gezuiverde monocytenkweken geen significante invloed heeft op de virusproductie. Dit is evenmin het geval indien  $1 \times 10^6$  of  $2 \times 10^6$  gezuiverde lymfocyten aan gezuiverde monocytenkweken worden toegevoegd (tabel 14). Indien echter met PHA gestimuleerde, gezuiverde lymfocyten worden toegevoegd, blijkt de virusproductie significant (t-toets,  $p < 1\%$ ) ( $n = 9$ ) af te nemen. Een mogelijke verklaring voor de verminderde virusproductie zal in de discussie worden gegeven.

#### 5.2.10. Vermenigvuldiging van avirulente en virulente poliovirusstammen in lymfocytenkweken

In 3 experimenten met gepaarde waarneming werd het replikatiepatoon van zowel een virulente (prototype-stam type 1) als een avirulente (vaccinstam van

Tabel 14. Invloed van PHA en/of lymfocyten op de virusproductie in kweken van gezuiverde monocysten (n = 9)

PHA 0,5% (v/v)	Aantal toegevoegde lymfocyten	Virusproductie (d <sub>4</sub> ) (PFU/ml), gem. $\pm$ v.c.	p <sup>1)</sup> (t-toets)
-		3000 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 70%	
+		3200 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 74%	ns
-	1 x 10 <sup>6</sup>	3300 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 34%	ns
	2 x 10 <sup>6</sup>	3500 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 33%	ns
+	1 x 10 <sup>6</sup>	2500 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 47%	p < 1%
	2 x 10 <sup>6</sup>	2700 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 45%	p < 1%

1) Getoetst of betreffende virusproductie significant afwijkt van virusproductie in kontrôlekweek (-).

Tabel 15. Vermenigvuldiging van een avirulente, virulente en "geadapteerde" polio-virusstam in kweken van gezuiverde en ongezuiverde lymfocyten (n = 3)

Virusstam	Viru- len- tie	Virusproductie (d <sub>4</sub> ) (PFU/ml), gem. $\pm$ v.c.			
		ongezuiverde lymfocyten		gezuiverde lymfocyten	
		-PHA	+PHA	-PHA	+PHA
Kontrolestam type 1	-	600 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 53%	450 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 52%	50 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 45%	75 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 43%
Prototype-stam (Mahoney) type 1	+ <sup>1)</sup>	400 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 55%	350 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 53%	50 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 45%	50 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 39%
Vaccinstam (Sabin) type 1	-	750 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 55%	650 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 57%	60 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 44%	100 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 46%
Kontrolestam (niet geadapteerd) type 1		400 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 30%	350 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 33%	10 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 37%	15 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 33%
"Geadapteerde" stam type 1		800 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 36%	700 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 29%	20 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 37%	25 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 35%

1) Volgens Verlinde et al.(1970).

type 1) stam van poliovirus vergeleken met dat van onze kontrôle-stam. De virusproduktie werd bepaald in kweken van gestimuleerde en niet gestimuleerde, van zowel gezuiverde als niet gezuiverde lymfocyten. Er werd geen significant verschil in virusproduktie tussen de kontrôle-stam enerzijds en de beide overige stammen anderzijds gevonden (tabel 15). De virusopbrengst voor de avirulente stam leek groter dan die voor de virulente stam.

Verder werd een onderzoek verricht met een aan lymfocyten "geadapteerde" poliovirusstam die was verkregen door de controle-stam 6 maal te passeren in gezuiverde met PHA gestimuleerde lymfocyten, zoals beschreven werd door o. a. Eustatia (1971). De virustiters van deze stam in kweken van gestimuleerde en ongestimuleerde, van zowel gezuiverde als ongezuiverde lymfocyten, leken hoger dan die van de kontrôle-stam (tabel 15). PHA had echter geen effect op de virusproduktie van de "geadapteerde" stam, zoals dit het geval was voor aan muizelymfocyten "geadapteerd" mengovirus (Eustatia, 1971).

#### 5.2.11. Onderzoek naar de ontwikkeling der virusgevoeligheid van kweken van lymfocyten en van monocytenkweken tijdens de kweekperiode

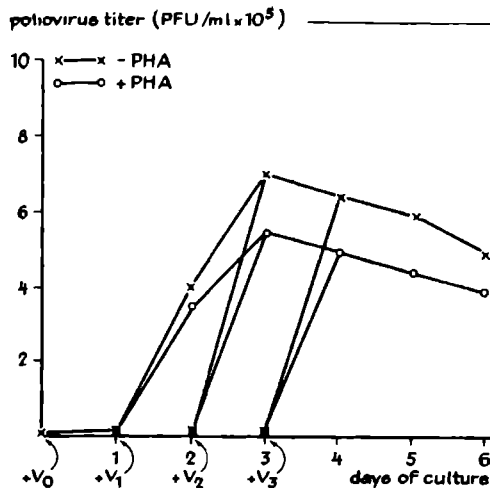
Uit het replikatiepatroon van poliovirus en de ontwikkeling der "infektive centers" in ongezuiverde lymfocytenkweken kan worden gekonkludeerd dat de toename van de virusproduktie, na een aanvankelijke "lag"-periode van 1 à 2 dagen, gepaard gaat met een geleidelijke toename van het aantal virus producerende cellen. Aangezien het systeem reeds bij een M.O.I. van 1 PFU/cel verzaadigd is, moet deze toename van het aantal virus producerende cellen toegeschreven worden aan een geleidelijke verandering in de gevoeligheid van cellen voor poliovirus: aanvankelijk ongevoelige cellen zouden geleidelijk gevoeliger worden.

Deze veronderstelling werd bevestigd door het volgende onderzoek.

In 6 experimenten werd het effect bestudeerd van toevoeging van poliovirus (1 PFU/cel) op opeenvolgende dagen (dag 0 tot en met 3) na het inzetten van ongezuiverde, gestimuleerde en niet gestimuleerde lymfocyten. Na een adsorptieperiode van 1 uur werd het niet geadsorbeerde virus door 3 maal wassen verwijderd. De virusopbrengst werd op opeenvolgende dagen bepaald. De resultaten zijn samengevat in figuur 10. Hieruit valt af te lezen dat, onafhankelijk van het tijdstip waarop virus wordt toegevoegd, toch op hetzelfde tijdstip dezelfde virusopbrengst wordt bereikt, welke verkregen werd bij enting op dag 0.

De aanvankelijk optredende "lag"-periode in de virusproduktie na enting van virus op dag 0, is reeds bij enting op de eerste dag verdwenen en enting op de tweede dag geeft reeds na 24 uur de maximale virusopbrengst.

Men mag dus aannemen dat na een inkubatieperiode van 24 à 48 uur de voor de



Figuur 10. Invloed van het tijdstip der virusbeënting op het patroon der virusvermenigvuldiging in kweken van ongezuiverde lymfocyten. Weergegeven zijn de gemiddelden van 6 experimenten. De kweken werden op opeenvolgende dagen, tot en met de 3de dag na inzetten der kweken, beënt met 10 PFU/cel poliovirus. Na een virusadsorptieperiode van 1 uur werd het niet geadsorbeerde virus weggewassen.

Tabel 16. Invloed van Actinomycine D op de virusproductie in kweken van ongezuiverde lymfocyten (n = 3)

+ Act. D <sup>1)</sup> 0,1 µgr/ml	RNA-synthese (d <sub>4</sub> ) <sup>2)</sup> %	DNA-synthese (d <sub>4</sub> ) <sup>3)</sup> %	Virusproductie (d <sub>4</sub> ) <sup>4)</sup> (PFU/ml), gem. ± v. c.	
			- PHA	+ PHA
-	100%	100%	700 × 10 <sup>3</sup> ± 83%	650 × 10 <sup>3</sup> ± 79%
dag 0	1%	1%	10 × 10 <sup>3</sup> ± 6%	10 × 10 <sup>3</sup> ± 4%
dag 1	1%	1%	10 × 10 <sup>3</sup> ± 5%	10 × 10 <sup>3</sup> ± 6%
dag 2	1%	1%	400 × 10 <sup>3</sup> ± 63%	400 × 10 <sup>3</sup> ± 62%
dag 3	1%	1%	650 × 10 <sup>3</sup> ± 69%	550 × 10 <sup>3</sup> ± 72%
dag 4	5%	25%	700 × 10 <sup>3</sup> ± 82%	650 × 10 <sup>3</sup> ± 83%

1) Actinomycine D.

2) RNA-synthese (<sup>3</sup>H-UR-inkorporatie) op dag 4 in met PHA gestimuleerde kweken zonder virus en zonder Act. D.: gesteld op 100%.

3) DNA-synthese op dag 4 in met PHA gestimuleerde kweken zonder virus en zonder Act. D.: gesteld op 100%.

4) Aanvangstiter op dag 0: 15 × 10<sup>3</sup> ± 5% PFU/ml.

virusproductie verantwoordelijke cellen een maximale gevoeligheid voor poliovirus hebben verworven. Het replikatiepatroon van poliovirus in deze gevoelig geworden celpopulatie is ongeveer gelijk aan dat in HeLa-cellen (zie Howes, 1959). Hierin wordt na ongeveer 12 uur na de enting met virus de maximale virustiter bereikt. De ontwikkeling van de virusgevoeligheid kan worden geblokkeerd door toevoeging van actinomycine D\* (0,1  $\mu$ gr/ml). Dit antibiotikum is bij deze concentratie in staat de cellulaire RNA-synthese van met PHA gestimuleerde lymfocyten te remmen (Kay et al., 1969) doch heeft geen invloed op de replikatie van poliovirus (Melnick et al., 1961). Zoals uit tabel 16 blijkt, waarin de resultaten van 3 experimenten worden samengevat, resulteert toevoeging van actinomycine D op dag 0 en dag 1 in volledige remming en op dag 2 in onderdrukking van de virusproductie, terwijl toevoeging op dag 3 geen invloed meer heeft. De in de voorgaande paragrafen beschreven experimenten wezen er op dat de monocyt de voor de virusreplikatie verantwoordelijke cellen zijn. Daarom werden bovenstaande experimenten 3 maal herhaald met kweken van gezuiverde monocyt. De resultaten zijn kwalitatief in overeenstemming met die voor kweken van ongezuiverde lymfocyten.

Uit bovenstaande mogen we konkluderen dat de monocyt zich in vitro binnen 24 à 48 uur ontwikkelt van een aanvankelijk, voor poliovirus, ongevoelig celtype tot een voor poliovirus gevoelig celtype.

\* van Merck

### 5.3. Konklusies

De voornaamste konklusies van dit hoofdstuk worden in het kort geresumeerd:

- a) Poliovirus vermenigvuldigt zich zowel in kweken van ongezuiverde als van gezuiverde lymfocyten, doch de virusopbrengst is in kweken van gezuiverde lymfocyten ongeveer 10 maal lager dan in kweken van niet gezuiverde lymfocyten.
- b) Stimulering der lymfocyten met phytohaemagglutinine (PHA) heeft geen effect op het patroon der virusvermenigvuldiging.
- c) In partieel gezuiverde kweken van polymorfkernige leukocyten (PMN) treedt virusinaktivatie op.  
Uit a, b en c valt te konkluderen dat noch de kleine lymfocyt, noch de lymfoblast noch de PMN verantwoordelijk is voor de virusreplikatie in ongezuiverde kweken.
- d) De monocyt is de gastcel waarin het poliovirus zich vermeerdert.  
Men kan berekenen dat de virusopbrengst per cel ongeveer 10 PFU bedraagt.
- e) De monocyt ontwikkelt zich in vitro gedurende 24 à 48 uur van een voor poliovirus ongevoelig tot een voor poliovirus gevoelig celtype.
- f) Geen der onderzochte variabelen vormde een verklaring voor de diskrepantie met de resultaten van Willems et al. (1969b).



Phytohemagglutinine (PHA) veroorzaakt in vitro de transformatie van kleine lymfocyten tot grote basofiele en zich delende lymfoblasten. Dit aktiveringsproces gaat gepaard met een stimulatie der RNA- en eiwitsynthese en een inductie der DNA-synthese (Robbins, 1964, Elves, 1966, Ling, 1968, Naspitz et al., 1968).

Uit ons onderzoek bleek dat poliovirus in staat is de door PHA geïnduceerde DNA-synthese van lymfocyten te remmen. Onze bevindingen kloppen in kwantitatief opzicht niet met die van Willems et al.(1969c). In onze experimenten werd een betrekkelijk geringe remming (gemiddeld 33%) waargenomen, terwijl Willems et al steeds een remming van 50% of groter vonden. Wij hebben geen verklaring voor dit verschil kunnen vinden. Wel is het opmerkelijk dat bij naberekening van de waarden van een representatieve kurve in een publikatie van Willems et al (1969c) het remmingspercentage niet 50% of hoger, doch slechts ongeveer 25% blijkt te zijn.

Eveneens in tegenstelling met de resultaten van Willems et al.(1969c) vonden wij in geïnfecteerde kweken geen significant hogere celsterfte dan in niet geïnfecteerde kweken. De door hen gevonden grotere celsterfte van 10 tot 20% in geïnfecteerde kweken vormde echter, zoals zij betogen, geen verklaring voor de remming der DNA-synthese van 50% of groter.

Rubellavirus geeft ook een aanzienlijke remming van de door PHA geïnduceerde DNA-synthese van lymfocyten, zonder zichtbaar cytopathologisch effect (Olson et al., 1968). Savel et al.(1970) toonden aan dat de door rubellavirus geïnduceerde remming verband houdt met de graad van virulentie van de gebruikte rubellavirusstam. Wildtype stammen gaven een gemiddelde remming van 85%, avirulente stammen gemiddeld 25%. Een dergelijk verband kon voor poliovirus door ons niet worden aangetoond. Er bestonden geen wezenlijke verschillen in remmend vermogen tussen de door ons onderzochte virulente en avirulente poliovirusstammen.

Eustatia (1971) toonde aan, dat mengovirus eerst na "adaptie", door herhaalde passage in met PHA gestimuleerde, gezuiverde muizelymfocyten, in staat was de DNA-synthese te remmen. De remming was overigens het gevolg van celsterfte.

Wij vonden geen verschillen in remmingsgraad tussen een 6 maal in humane lymfocyten gepasseerde poliovirusstam en de niet gepasseerde controle-stam.

Ook voor andere virussen, zoals VSV, rco-, herpes-, en vacciniavirus werd een, passeerbaar, remmend effect op de door PHA geïnduceerde DNA-synthese



gevonden, die echter in alle gevallen toegeschreven kon worden aan het optreden van een cytopathologisch effect (Willems et al., 1969a). Ook mazelen remt de PHA-respons (Zweiman, 1971).

Mycoplasma kan eveneens de door PHA geïnduceerde DNA-synthese van lymfocyten remmen (Copperman et al., 1966; Simberkoff et al., 1969). Het is echter vrijwel uitgesloten dat het remmend effect van poliovirus zou berusten op de aanwezigheid van mycoplasma in de virusinokula. Immers, in geen der door ons gebruikte virusinokula kon mycoplasma worden aangetoond. Bovendien bleef de remming aantoonbaar ondanks sterke verdunning (1 : 10.000) van het virusinokulum (de door mycoplasma geïnduceerde remming van 75 - 90% is reeds na 100-voudige verdunning niet meer aanwezig)\* en ondanks toevoeging aan de kweken van kanamycine of neomycine,\* twee antibiotika die de door mycoplasma geïnduceerde remming der <sup>3</sup>H-TdR inkorporatie in HeLa-cellen voorkomen (Perez et al., 1972). De remming is afhankelijk van infectieus virus en bleef achterwege na toevoeging van antiserum tegen poliovirus.\*

Onze bevindingen inzake het effect van PHA op de vermenigvuldiging van poliovirus in ongezuiverde lymfocytenkweken zijn eveneens in strijd met die van Willems et al. (1969b). Laatstgenoemde onderzoekers vonden een verhoging (gemiddeld 10 maal) van de virusproductie in lymfocytenkweken die met PHA waren gestimuleerd. Wij vonden daarentegen geen effect van PHA op de virusproductie; er bestond zelfs een, overigens niet significante, tendens tot verlaging

Het percentage "infective centers" nam in onze experimenten niet toe onder invloed van PHA. Evenals Gresser et al. (1964) in niet gestimuleerde, ongezuiverde lymfocytenkweken, vonden wij zowel in gestimuleerde als niet gestimuleerde kweken 5 tot 10% "infective centers". Willems et al. (1969b) vonden daarentegen onder invloed van PHA een toename van het aantal "infective centers" van ongeveer 1% in niet gestimuleerde, tot ongeveer 10% in gestimuleerde, ongezuiverde lymfocytenkweken.

Het verschil inzake het effect van PHA op de vermenigvuldiging van poliovirus tussen ons onderzoek en dat van Willems et al. kon, evenals het verschil inzake de remming van de door PHA geïnduceerde DNA-synthese door poliovirus, niet worden toegeschreven aan cultuurkondities of experimentele opzet.

\* Niet in dit proefschrift gepubliceerde gegevens.

Het patroon der virusvermenigvuldiging onderging evenmin een wijziging onder invloed van PHIA, bij gebruik van andere, zowel virulente als avirulente stammen, noch bij gebruik van een "geadapteerde" poliovirusstam, zoals door Eustatia (1971) voor "geadapteerd" mengovirus werd gevonden.

Dat PHA geen invloed heeft op de vermenigvuldiging van poliovirus in ongezuiverde lymfocytenkweken, werd eveneens duidelijk uit de experimenten waarin het effect van de PHA-koncentratie en van het tijdstip van PHA toevoeging werden onderzocht. Terwijl deze factoren een aanzienlijke invloed hadden op de PHA-respons, was de virusvermenigvuldiging onafhankelijk van deze factoren. Bovendien bleek uit experimenten met een virusinokulum dat met mycoplasma besmet bleek te zijn, de reactie op PHA sterk geremd ( $\pm$  75% remming der DNA-synthese) terwijl de virusopbrengst niet was afgenomen. Het is bekend dat mycoplasma geen invloed heeft op de vermenigvuldiging van poliovirus (Hargreaves et al., 1970). Onze waarneming dat in met mycoplasma verontreinigde kweken van Vero-cellen de plaquevorming door poliovirus niet of nauwelijks afwijkt van die in niet besmette kweken, is hiermee in overeenstemming\*.

Voor andere virussen werd onder invloed van PHA een inductie (herpesvirus: Nahmias et al., 1964; bofvirus: Duc-Nguyen et al., 1966, vacciniavirus: Miller et al., 1968) of een stimulatie (vesicular stomatitisvirus: Edelman et al., 1968; poliovirus: Willems et al., 1969b) van de virusvermenigvuldiging in ongezuiverde lymfocytenkweken gevonden. Deze toename bleek in al deze gevallen gekoppeld aan een toename van het aantal virus-bevattende cellen. PHA had geen invloed op de vermenigvuldiging van rubellavirus (Mellman et al., 1965) NDV, reo-, sindbis-, influenza A-, influenza B-, sendai-, adeno- en herpesvirus (Willems et al., 1969a) varicella- en cytomegalovirus (Gönczöl et al., 1969) in ongezuiverde lymfocytenkweken.

PIIA verminderde zelfs de opbrengst van gele koorts virus (Wheelock et al., 1969) in ongezuiverde lymfocytenkweken. PHA induceert in ongezuiverde lymfocytenkweken interferon (Wheelock, 1965; Friedman et al., 1967; Green et al., 1969) hetgeen mogelijk de verklaring vormt voor deze vermindering. Gresser et al. (1964) toonden aan dat exogeen interferon nog in een hoge verdunning in staat was de vermenigvuldiging van poliovirus in niet gestimuleerde, ongezuiverde lymfocyten te remmen.

Hoewel wij in onze experimenten eveneens een tendens tot verlaging der poliovirusopbrengst onder invloed van PHA waarnamen, waren wij tot op heden toe niet in staat een eventuele, geringe hoeveelheid interferon in onze kweken aan te tonen.\*

\* Niet in dit proefschrift gepubliceerde gegevens.

Duc-Nguyen et al (1966) en Miller et al (1968) wezen reeds op de paradox, dat PHA enerzijds de virusreplikatie van sommige virussen in lymfocyten blijkt te verhogen, anderzijds juist de virusresistentie bevordert door inductie van de interferonsynthese.

Wij waren niet in staat in gezuiverde lymfocytenkweken onder invloed van PHA een verhoging der opbrengst van poliovirus aan te tonen. Andere onderzoekers vonden in gezuiverde, niet gestimuleerde lymfocyten geen, doch na PHA stimulatie wél virusvermenigvuldiging van VSV (Edelman et al., 1968), vaccina virus (Miller et al., 1968) en gele koorts virus (Wheelock et al., 1969). Zij kwamen op basis van deze resultaten tot de konklusie dat deze virussen niet in kleine lymfocyten kunnen vermenigvuldigen, doch wel in door PHA geïnduceerde lymfoblasten. De door PHA geïnduceerde, morfologische en metabolische veranderingen van de lymfocyt zouden een noodzakelijke voorwaarde zijn voor de virusreplikatie (Edelman et al., 1968).

Hoewel poliovirus werd aangetroffen in polymorfkernige leukocyten (Kovács et al., 1963, Nelson et al., 1963, 1964, Sommerville et al., 1964) speelt dit celtype waarschijnlijk geen rol in de vermenigvuldiging van poliovirus. In overeenstemming met de bevindingen van Edelman et al. (1968) voor VSV en Wheelock et al. (1969) voor gele koorts virus, toonden wij aan dat poliovirus in partieel gezuiverde PMN kweken wordt geïnactiveerd. PMN blijken bovendien in vitro binnen ongeveer 48 uur volledig te degenereren (Elves et al., 1962, Quaglino et al., 1962, Yoffey et al., 1965).

Samenvattend bleek uit ons onderzoek dat poliovirus zich niet of nauwelijks in kleine lymfocyten of lymfoblasten vermenigvuldigt en evenmin in polymorfkernige leukocyten.

Daarentegen vond er wel virusvermenigvuldiging plaats in monocyten. Hiervoor werden reeds door Gresser et al. (1964) aanwijzingen gevonden. De monocyt blijkt ook gastcel te kunnen zijn voor de vermenigvuldiging van andere virussen, zoals VSV (Edelman et al., 1967) en gele koorts virus (Wheelock et al., 1969).

Toevoeging van PHA of van niet gestimuleerde, gezuiverde lymfocyten had geen invloed, doch toevoeging van met PHA gestimuleerde lymfocyten gaf een significante vermindering van de virusopbrengst in monocytenkweken. Deze waarneming laat zich wellicht verklaren uit de experimenten van Epstein et al. (1971a) die aantoonde, dat voor de door PHA geïnduceerde interferonsynthese in lymfocytenkweken de aanwezigheid van makrofagen vereist is. Experimenten zijn in voorbereiding om deze hypothese te toetsen.

De geringe vermenigvuldiging van poliovirus in gezuiverde lymfocytenkweken zou kunnen worden verklaard door de aanwezigheid van, na de zuiveringsprocedure

achtergebleven ("residu") monocyten (minder dan 1%). Ook andere auteurs vermelden dat de aanwezigheid van een kleine fraktie monocyten na de zuiveringsprocedure niet is uit te sluiten (Oppenheim et al., 1968, Seeger et al., 1970, Alter et al., 1970, Shortman et al., 1971).

Uit onze experimenten werd duidelijk dat de monocyt als zodanig niet gevoelig is voor poliovirus, maar pas na een inkubatieperiode van 24 - 48 uur in vitro zich tot een virus-gevoelig celttype ontwikkelt. Deze ontwikkeling werd geblokkeerd door actinomycine D. Aangezien er geen aanwijzingen waren voor een toxische invloed van actinomycine D op de cellen, zou dit kunnen betekenen dat de RNA-synthese een voorwaarde is voor het ontstaan van het virus-gevoelige stadium. Wij hebben het mechanisme, dat verantwoordelijk is voor de ontwikkeling van de gevoeligheid, niet verder onderzocht. Hoogstwaarschijnlijk houdt deze ontwikkeling der virus-gevoeligheid verband met de door Cohn et al. (1965) beschreven in vitro transformatie van monocyt tot makrofag, een verandering die zich binnen 24 - 48 uur voltrekt en gepaard gaat met een toename van de RNA- en eiwitsynthese, van het aantal ribosomen en lysosomen en van de activiteit van de lysosomale hydrolytische enzymen. Deze morfologische en biochemische veranderingen zouden een voorwaarde kunnen zijn voor de replicatie van het virus, zoals reeds door Edelman et al. (1967) werd gesuggereerd. Men zou in dit verband kunnen denken aan de synthese van virusspecifieke oppervlaktereceptoren (Holland et al., 1962), aan een activiteitstoename van de, bij het "uncoating" proces van het virion betrokken, hydrolytische enzymen (Mandel, 1967), of aan de produktie van een groot aantal, voor de virusspecifieke eiwitsynthese noodzakelijke, ribosomen (Penman et al., 1963).

Door andere onderzoekers werd aangetoond dat een groot aantal virussen zich kan vermenigvuldigen in makrofagen van verschillende oorsprong, zoals muzehepatitisvirus (Bang et al., 1960), arbovirus (Goodman et al., 1962), herpesvirus (Johnson, 1964), ectromeliavirus (Roberts, 1964), vacciniavirus (Tompkins et al., 1970), vesicular stomatitis-, mengo-, reo-, sendaivirus (Eustatia et al., 1971).

Reeds in 1957 vermeldde Barski, dat poliovirus zich in cellen van het reticulo-endotheliale systeem kan vermenigvuldigen. Daarentegen vonden Berman et al. (1962) geen replicatie van poliovirus in 3 - 4 weken oude makrofagenkweken. In hoeverre de ouderdom van de kweken met betrekking tot de virus-gevoeligheid een rol speelt, verdient nader onderzoek. Vele factoren blijken een rol te spelen in de gevoeligheid van makrofagen voor virussen, zoals de genetische eigenschappen van de gastheer (Bang et al., 1960, Goodman et al., 1962, Kantoch et al., 1963), leeftijd van de gastheer (Johnson, 1964, Hirsch et al., 1970, Stevens et al., 1971), virulentie van het virus (Roberts, 1964, Benda et al., 1970) en immuunstatus van de gastheer (Tompkins et al., 1970, Avila et al., 1972).

### Verklaring van de remming van de door PHA geïnduceerde DNA-synthese door poliovirus

De lymfocyt-virusinteractie is een complex fenomeen, aangezien zowel immunologische als virologische mechanismen werkzaam kunnen zijn. Het virion is immers niet alleen een infectieus agens, maar werkt eveneens als antigeen in een mogelijk immunokompetent systeem de lymfocytenkweek. Het lijkt echter uitermate onwaarschijnlijk dat de remming van de DNA-synthese op een immunologisch mechanisme berust, zoals bijvoorbeeld door de bij de specifieke antigeenstimulatie vrijkomende "DNA-synthesis Inhibiting Factor" (Smith et al., 1970) of door antigeen-kompetitie (Moller, 1972). Immers, het remmend effect van poliovirus bleef achterwege, indien geïnactiveerd poliovirus, dat dan alleen als antigeen werkzaam is, werd gebruikt.

Een combinatie van de van infectieus-virus afhankelijke remming van de DNA-synthese en van de van virusantigeen-afhankelijke specifieke stimulatie zou een oorzaak kunnen zijn van variabele resultaten, zoals reeds door Zweiman (1971) werd benadrukt voor de remming van de door PHA geïnduceerde DNA-synthese door mazelenvirus.

Een abortieve infectie van de kleine lymfocyt, zoals door Willems et al. (1969c) werd geopperd, lijkt, mede uitgaande van hun eigen resultaten, onwaarschijnlijk. Het laat zich uit een van hun publikaties (1969b) berekenen dat slechts maximaal ongeveer 1% der kleine lymfocyten abortief geïnfecteerd kan zijn. Tezamen met de ongeveer 10% "infective centers", -door hen gevonden-, lijkt het onwaarschijnlijk dat deze kleine fraktie geïnfecteerde cellen een verklaring vormt voor de door hen waargenomen remmingen van 50% of groter. Dit zou slechts mogelijk zijn indien men een uit de geïnfecteerde cellen vrijkomende en in het kweekmedium oplosbare, DNA-synthese remmende faktor aanneemt. Een dergelijke faktor echter, maakt de verklaring van de remming middels een abortieve infectie overbodig.

Dat poliovirus rechtstreeks invloed zou kunnen uitoefenen op de DNA-synthese van lymfoblasten, lijkt eveneens uitgesloten daar ons onderzoek aantoonde dat lymfoblasten geen rol van betekenis spelen bij de virusreplikatie.

Het is de monocyt (makrofaag) waarin het virus repliceert. Bovendien bleek uit de resultaten dat de monocyt (makrofaag) noodzakelijk is voor de remming der DNA-synthese.

Men zou zich kunnen voorstellen dat bij de infectie van de monocyt (makrofaag)

door poliovirus, hydrolytische enzymen vrijkomen (Hotham et al., 1966), die het exogene TdR zouden kunnen afbreken, zodat dit beperkend wordt, waardoor de  $^3\text{H}$ -TdR-inkorporatie afneemt. Dit lijkt echter niet aannemelijk, daar een 10 voudige verlaging der specifieke aktiviteit van  $^3\text{H}$ -TdR geen invloed had op remming en verversing van het medium onmiddellijk vóór de labelingsprocedure de remming niet voorkwam (niet gepubliceerde gegevens). Overigens zou deze veronderstelling impliceren, dat de remming der DNA-synthese, na infectie met poliovirus op de 3e en 4e dag na stimulatie met PHA, even groot zou dienen te zijn als na de infectie op de eerste dagen van de kweek, hetgeen niet het geval bleek te zijn.

Tenslotte postuleren wij de volgende hypothese die een verklaring zou kunnen geven van de meeste in dit proefschrift vermelde resultaten. De experimenten in hoofdstuk 3 en 4 toonden aan dat de monocyt (makrofaag) noodzakelijk is voor een optimale stimulatie van lymfocyten door PHA. Dit bevestigt de waarneming van anderen, dat zowel na stimulatie met specifiek antigeen (Hersh et al., 1968; Seiger et al., 1970, Alter et al., 1970, Hanafin et al., 1970) als na stimulatie met PHA (Wilson, 1966, Oppenheim et al., 1968, Lewis et al., 1970, Alter et al., 1970) een verminderde reactie optrad in kweken van gezuiverde lymfocyten. Uit de experimenten in hoofdstuk 4 bleek, dat ook voor de remming van de DNA-synthese door poliovirus de monocyt (makrofaag) onmisbaar is. De in hoofdstuk 5 beschreven experimenten toonden aan dat de monocyt-makrofaag fungeert als gastcel voor de vermenigvuldiging van poliovirus.

Wij nemen aan dat voor de optimale stimulatie van lymfocyten door PHA, actief metaboliserende makrofagen noodzakelijk zijn. Andere onderzoekers toonden aan dat voor verschillende immuunreacties in vitro, de aanwezigheid van intakte makrofagen noodzakelijk is (Dutton et al., 1970, Bloom, 1971, Epstein et al., 1971a,b). Men zou zich kunnen voorstellen dat op een van de volgende wijzen de makrofaag een rol speelt in de PHA-stimulatie van de lymfocyt

- door een direct contact tussen makrofaag en lymfocyt (vergelijk "cluster-formation", Cline et al., 1968, Mosier, 1969)
- door de synthese van een extracellulaire faktor, zoals bijvoorbeeld de "Reconstitution Factor" (Alter et al., 1970)
- door adsorptie van PHA aan het oppervlak van de makrofaag, waardoor het PHA efficiënter aan de lymfocyt kan worden gepresenteerd, zoals dat voor antigeen beschreven is (Pierce, 1969, Unanue et al., 1969).

In ons laboratorium worden deze mogelijkheden nader onderzocht.

Wanneer nu de monocyt-makrofaag wordt geïnfecteerd door poliovirus, dan zal dit tot gevolg hebben dat de cellulaire RNA- en eiwitsynthese wordt geremd, zoals beschreven is voor andere met poliovirus geïnfecteerde cellen (Holland, 1964, Martin et al., 1968) waardoor de makrofaag niet meer in staat zou zijn de boven gesuggereerde rol bij de stimulatie van lymfocyten door PHA te vervullen en de PHA-respons dus suboptimaal blijft (zie figuur). Aangezien in kweken van gezuiverde lymfocyten de reactie op PHA reeds suboptimaal is, omdat het merendeel der monocyten werd weggezuiverd, zal toevoeging van poliovirus geen of nauwelijks effect hebben.

Volgens deze hypothese moet de reactie op PHA van ongezuiverde, met poliovirus geïnfecteerde lymfocyten ongeveer gelijk zijn aan die van gezuiverde, al of niet met poliovirus geïnfecteerde lymfocyten. Dit bleek ook inderdaad het geval te zijn (tabel 9). Immers, in beide systemen is de voor de PHA-stimulatie noodzakelijke activiteit van de makrofaag afwezig: in het ene geval door eliminatie van de makrofaag door de zuiveringsprocedure, in het andere geval door blokkering van het metabolisme van de makrofaag door de virusinfectie. Ook volgt uit deze hypothese dat de met monocyten gereconstitueerde kweken van gezuiverde lymfocyten zich op dezelfde wijze dienen te gedragen als niet gezuiverde lymfocytenkweken, hetgeen ook inderdaad werd waargenomen (tabel 9).

Met deze hypothese zou eveneens te verklaren kunnen zijn waarom de PHA geïnduceerde DNA-synthese van tonsillaire lymfocyten niet door poliovirus wordt geremd. Suspensies van tonsillaire lymfocyten bevatten immers nauwelijks monocyten (zie tabel 1), hetgeen ook zou kunnen verklaren waarom de reactie van gezuiverde en niet gezuiverde lymfocyten op PHA nauwelijks van elkaar afwijken en over het algemeen geringer zijn dan die van perifere lymfocyten.

Guanidine remt weliswaar de replicatie van poliovirus (Growther et al., 1961) doch voorkomt niet de door poliovirus geïnduceerde remming van de cellulaire RNA- en eiwitsynthese (Bablanian et al., 1965) maar wel de door poliovirus geïnduceerde remming der DNA-synthese (Powers et al., 1969). Daar guanidine dus de door virus geïnduceerde remming van de RNA- en eiwitsynthese der makrofaag niet voorkomt en de makrofaag dus ook nu, in afwezigheid van virus-replicatie, niet in staat is de voor de PHA stimulatie van lymfocyten noodzakelijke activiteit te ontplooiën, wordt het begrijpelijk waarom guanidine in ons systeem de remming der DNA-synthese door poliovirus niet voorkomt, zoals in het polio-HeLa-systeem (Powers et al., 1969).

Eveneens wordt uit de voorgestelde hypothese duidelijk waarom bij toevoeging van poliovirus op de 1e tot de 4e dag na PHA stimulatie, de remming der DNA-

# HYPOTHESE

Lymfocytenkweek

PHA-respons  
(DNA-synthese)

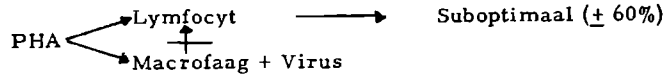
Ongezuiverd



Gezuiverd



Ongezuiverd + Poliovirus



Zie toelichting tekst.

Herhaling tabel 9 (geschematiseerd)

	PHA	Virus	DNA-synthese x 10 <sup>3</sup> cpm
Ongezuiverde lymfocyten	+	-	34
	+	+	18
Gezuiverde lymfocyten	+	-	19
	+	+	21
Gezuiverde lymfocyten + monocyten	+	-	34
	+	+	17
Gezuiverde monocyten	+	-	0,8
	+	+	0,2



synthese afneemt en bij toevoeging op de 4e dag nagenoeg verdwenen is. Immers, tot de 4e dag treden nog lymfoblasten in S-fase (Jasinska et al., 1970) en wordt op de 4e dag de maximale PHA respons gevonden. Tot dat tijdstip zijn de makrofagen waarschijnlijk actief bij de PHA-stimulatie der lymfocyt. Naarmate de makrofagen later, tijdens het proces der PHA stimulatie, worden geïnfecteerd, zijn ze langer in staat deze aktiviteit te ontplooiën en neemt de door virus geïnduceerde remming van de DNA-synthese af.

Er blijkt een goede korrelatie te bestaan tussen de M. O. I. die nog in staat is een signifikante remming der DNA-synthese te veroorzaken ( $10^{-3}$ ) en de M. O. I. die nog een maximale virusopbrengst op de 4e dag oplevert (eveneens  $10^{-3}$ ). Bij een lagere M. O. I. worden de makrofagen, die voor de virusproduktie verantwoordelijk zijn, niet meer onmiddellijk verzadigd, zodat en de maximale virusopbrengst op de 4e dag niet wordt bereikt en bovendien de niet geïnfecteerde makrofagen hun aktiviteit in de PHA stimulatie der lymfocyt kunnen blijven ontplooiën.

De door virus geïnduceerde remming van de PHA-respons is overigens geen verklaring voor het achterwege blijven van een stimulerend effect van PHA op de vermenigvuldiging van poliovirus in de lymfocytenkweken. Immers ook toevoeging van virus op de 3e of 4e dag waarop de PHA-respons optimaal is, gaf geen verhoogde virusopbrengst in PHA gestimuleerde lymfocytenkweken. Wij vonden geen verklaring voor het feit waarom de lymfoblast, in tegenstelling tot de makrofaag, ongevoelig is voor poliovirus. Het lijkt echter waarschijnlijk dat deze ongevoeligheid is gebaseerd op het ontbreken van virusspecifieke oppervlakte receptoren, daar de, in RNA- en eiwitsynthese zeer aktieve en van voldoende ribosomen en lysosomen voorziene lymfoblast een voor de vermenigvuldiging van poliovirus "permissive" celtype lijkt te zijn. In ons laboratorium zal dit nader worden onderzocht.

Wellicht ten overvloede moge er op gewezen worden dat de voorgestelde hypothese alleen is opgesteld ter verklaring van het remmend effect van poliovirus op de DNA-synthese van gestimuleerde lymfocyten, hoewel het niet is uitgesloten dat ze eveneens toepasbaar is op de remming der PHA-respons door andere virussen zoals rubellavirus (Olson et al., 1968) en mazelenvirus (Zweiman, 1971) en op de suboptimale PHA-respons bij verschillende ziekten (Overzicht, Rubin, 1970).

In hoeverre de voorgestelde hypothese een verklaring zou kunnen bieden voor de, door een aantal virussen geïnduceerde, dysfunctie van de cellulaire immuunreactie (Overzicht, Notkins et al., 1970), verdient nader onderzoek.

Na de cultuurkondities voor een optimale PHA-respons van de lymfocyt te hebben vastgesteld en de methoden ter bepaling van de DNA-synthese -<sup>3</sup>H-TdR inkorporatie- en van de virusopbrengst -de plaquemethode-, te hebben gestandaardiseerd, werd een onderzoek gedaan naar het mechanisme waarop poliovirus de door PHA geïnduceerde DNA-synthese van de humane, perifere lymfocyt remt, zoals werd beschreven door Willems et al.(1969c).

In kweken van met PHA gestimuleerde, ongezuiverde lymfocyten werd door ons een remming gevonden van gemiddeld 33%, hetgeen niet in overeenstemming is met de bevindingen van Willems et al.(1969c) die een remming vonden van 50% of groter. Noch de door ons partieel gemodificeerde cultuurkondities, noch de experimentele opzet vormden een verklaring voor dit verschil. Evenmin bestond er een significant verschil in remming tussen avirulente en virulente stammen van poliovirus

De remming is virusspecifiek en afhankelijk van infectieus virus en kan niet worden verklaard door een CPE van het virus

De remming nam af indien de lymfocytenkweken op opeenvolgende dagen na stimulatie met PHA, met poliovirus werden beënt. Toevoeging van virus op de 4de dag gaf geen significante remming meer. Een M.O.I. van  $10^{-2}$  PFU/cel gaf reeds de optimale remming en met een M.O.I. van  $10^{-3}$  PFU/cel was de remming nog significant.

Guanidine, dat de replicatie van poliovirus remt, voorkomt niet de door poliovirus geïnduceerde remming van de DNA-synthese

In kweken van, over een kolom, gezuiverde lymfocyten bleek de PHA-respons significant ( $p < 0,1\%$ ) te zijn verminderd.

Bovendien bleek in kweken van gezuiverde lymfocyten de door poliovirus geïnduceerde remming der DNA-synthese afwezig te zijn.

De op basis van deze gegevens geopperde veronderstelling dat de monocyt-makrofaag noodzakelijk is voor zowel een optimale PHA respons van de lymfocyt als voor de door poliovirus geïnduceerde remming hiervan werd bevestigd in een 15-tal experimenten met gepaarde waarneming, waarin naast elkaar de PHA-respons en de door virus geïnduceerde remming van de DNA-synthese werden bepaald in kweken van gezuiverde en ongezuiverde lymfocyten en van met monocyten gereconstitueerde kweken van gezuiverde lymfocyten. De DNA-synthese in kweken van gestimuleerde, ongezuiverde lymfocyten met virus bleek gelijk te zijn aan de DNA-synthese in kweken van gestimuleerde, gezuiverde lymfocyten met én zonder virus. In de met monocyten gereconstitueerde kweken van gezuiverde lymfocyten komen de PHA-respons en de remming door poliovirus overeen met die in kweken van ongezuiverde lymfocyten.

Dat de monocyt-makrofaag een belangrijke rol speelt in dit systeem werd eveneens ondersteund door de waarneming dat de monocyt-makrofaag verantwoordelijk is voor de vermenigvuldiging van poliovirus in kweken van ongezuiverde lymfocyten. In tegenstelling met de bevindingen van Willems et al. (1969b) konden wij geen stimulerend effect van PHA op de virusproductie waarnemen, noch in kweken van ongezuiverde, noch in kweken van gezuiverde lymfocyten.

Reeds een M. O. I. van  $10^{-2}$  PFU/cel bleek het systeem te kunnen verzadigen en leverde de optimale virusopbrengst op.

PHA had evenmin een stimulerend effect op de vermenigvuldiging van door ons onderzochte virulente en avirulente stammen van poliovirus in kweken van gezuiverde en ongezuiverde lymfocyten.

Uit ons onderzoek liet zich afleiden dat de monocyt als zodanig niet virusgevoelig is, doch zich tijdens een inkubatieperiode van 24 à 48 uur in vitro ontwikkelt tot een virus-gevoelig celtype. Deze ontwikkeling is waarschijnlijk gekorreleerd met de transformatie in vitro van monocyt tot makrofaag (Cohn et al., 1965).

Op basis van de resultaten in dit proefschrift werd een hypothese opgesteld ter verklaring van de door poliovirus geïnduceerde remming der DNA-synthese van de met PHA gestimuleerde lymfocyt.

Verondersteld werd dat de door poliovirus geïnfecteerde monocyt-makrofaag niet meer in staat is, door een door poliovirus geïnduceerde remming van het celmetabolisme, zijn noodzakelijke functie voor een optimale stimulatie van de lymfocyt door PHA te ontplooiën.

De voorgestelde hypothese biedt mogelijk ook een verklaring voor de door rubella- en mazelenvirus geïnduceerde remming van de PHA respons alsmede voor sommige door virus veroorzaakte immunodeficiënties.

After establishment of the culture conditions for an optimal response of the human, peripheral lymphocyte to phytohaemagglutinin (PHA) and standardization of the methods for determination of DNA synthesis and virus yield, we studied the mechanism of the poliovirus-induced inhibition of DNA synthesis in PHA-stimulated lymphocytes, as described by Willems et al. (1969c).

In contrast to the results of Willems et al., who consistently observed a virus-induced inhibition of 50% or more, we found a mean inhibition of 33% in non-purified lymphocyte cultures. Neither the culture conditions, nor the experimental approach could account for this difference.

The inhibition was virus-specific, depended on infectious virus, but was not prevented by guanidin, an inhibitor of poliovirus multiplication. The decline of DNA synthesis was not caused by virus-induced cell death.

No difference in inhibition was observed between virulent and non-virulent strains of poliovirus.

Inoculation of poliovirus on successive days after PHA-stimulation resulted in a decrease of the degree of inhibition and virus inoculation from the 4<sup>th</sup> day was no longer accompanied by significant inhibition.

The maximal inhibition was already found at a multiplicity of infection (M. O. I.) of  $10^{-2}$  PFU/cell, a M. O. I. of  $10^{-3}$  PFU/cell still inhibited the DNA synthesis to a significant extend.

In cultures of column-purified lymphocytes, the PHA-response was significantly reduced ( $p < 0, 1\%$ ).

The virus-induced inhibition of DNA synthesis was absent in these cultures.

Experiments with monocyte-reconstituted cultures of purified lymphocytes, confirmed our hypothesis that the monocyte-macrophage is required for an optimal PHA-response of the lymphocyte and its inhibition by poliovirus.

It became clear that the DNA synthesis of PHA-stimulated, non-purified lymphocyte cultures, infected with poliovirus, was about equal to the DNA synthesis of PHA-stimulated, purified, non-infected lymphocyte cultures.

The central role of the monocyte-macrophage in the system was supported by the fact that this celltype was found to be the host cell for virus multiplication in non-purified lymphocyte cultures.

In contrast to the results of Willems et al. (1969b), we observed, neither in purified, nor in non-purified lymphocyte cultures, a stimulating effect on virus

production by PHA.

The maximal virus yield was already obtained at a M.O.I. of  $10^{-2}$  PFU/cell. Virulent and non-virulent strains of poliovirus behaved in the same way.

It was concluded from the results that the monocyte as such is probably not responsible for virus multiplication, but that it develops into a virus-susceptible cell only after in vitro incubation for 24 - 48 hours.

This development could well correspond with in the in vitro transformation of monocytes to macrophages (Cohn et al., 1965).

On the basis of our results we proposed a hypothesis to explain the poliovirus-induced inhibition of DNA synthesis of the PHA-stimulated human, peripheral lymphocyte.

We suggest that the virus-infected monocyte-macrophage is unable, caused by the virus-induced inhibition of cell metabolism (Holland, 1964), to participate in an optimal stimulation of the lymphocyte by PHA.

This hypothesis could also account for the rubella- (Olson et al., 1968) and the measles-induced (Zweiman, 1971) inhibition of the PHA-response of the lymphocyte and possibly also for some virus-induced immunodeficiencies.

Literatuurreferenties

- Ackermann, W.W., Cox, D.C., Dinka, S., Biochem. Biophys. Res. Comm. 19, 745, 1965a.
- Ackermann, W.W., Cox, D.C., Kurtz, H., Powers, C.D., Davies, S.J., J. Bact. 91, 1943, 1965b.
- Adler, W.H., Osunkoya, B.O., Takiguchi, T., Smith, R.T., Cell. Immunol. 3, 590, 1972.
- Allison, A.C., Brit. Med. Bull. 23, 60, 1967.
- Allison, A.C., in "Mononuclear Phagocytes", (Ed: Furth, R. van.) Blackwell Oxford (1970), 422.
- Allison, A.C., Denman, A.M., Barnes, R.D., Lancet 2, 135, 1971.
- Alter, B.J., Bach, F.H., Cell. Immunol. 1, 207, 1970.
- Avila, F.R., Schultz, R.M., Tompkins, W.A.F., Inf. and Imm. 6, 9, 1972.
- Bablanian, R., Eggers, H.J., Tamm, J., Virology 26, 100, 1965.
- Bach, F.M., Voynow, N.K., Science, 153, 545, 1966.
- Bachtold, J.G., Bubel, H.G., Gebhardt, L.P., Virology, 4, 582, 1957.
- Bain, B., Clin. Exp. Immunol. 6, 255, 1970.
- Bang, F.B., Warwick, A., Proc. Nat. Acad. Sci. 46, 1065, 1960.
- Baron, S., J. Gen. Physiol. 56, 193, 1970.
- Barski, G., Science 125, 448, 1957.
- Berg, G., Harris, E.K., Chang, S.L., Busch, K.M., J. Bact. 85, 691, 1963.
- Benda, R., Danes, L., Cinatl, J., Acta Virol. 14, 353, 1970.
- Bender, M.A., Prescott, D.M., Exp. Cell Res. 27, 221, 1962.
- Bennett, W.E., Cohn, Z.A., J. Exp. Med. 123, 145, 1966.
- Berkovitch, S., Starr, S., New Eng. J. Med. 274, 67, 1966.
- Berman, L., Stulberg, C.S., Lab. Invest. 11, 1322, 1962.
- Black, L., Berenbaum, M.C., Exp. Cell Res. 35, 9, 1964.
- Bloom, B.R., Bennett, B., Sem. Haemat. 7, 215, 1970.
- Bloom, B.R., Adv. Immunol. 13, 101, 1971.
- Bray, G.A., Anal. Biochem. 1, 279, 1960.
- Caron, G.A., Sarkany, J., Williams, H.S., Todd, A.P., Gell, H.M.C., Lancet 2, 1266, 1965.
- Carstairs, K., Lancet 2, 984, 1961.
- Chalmers, D.G., Cooper, E.H., Evans, C., Topping, N.E., Int. Arch. Allergy 32, 117, 1967.
- Chang, T.W., New Eng. J. Med. 284, 765, 1971.
- Channock, R.M., Hayflick, L., Barile, M.F., Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 41, 1961.

- Chung, M., Murphy, W.H., J.Nat.Canc.Inst. 44, 1231, 1970.
- Cline, M.J., Swett, V.C., J.Exp.Med. 121, 279, 1965.
- Clercq, E. de, Merigan, T.C., Ann.Rev.Med. 21, 17, 1970.
- Cohn, Z.A., Benson, B., J.Exp.Med. 121, 153, 1965.
- Cohn, Z.A., Adv.Immunol. 10, 163, 1969.
- Coombs, R.R.A., Franks, D., Progr.Allergy 13, 174, 1969.
- Cooper, E.H., Barkhan, P., Brit.J.Haemat. 9, 101, 1963.
- Cooper, E.H., Milton, J.D., Brit.J.Canc. 18, 701, 1964.
- Cooper, H.L., Rubin, A.D., Blood 25, 1014, 1965.
- Cooper, H.L., Rubin, A.D., Science 152, 516, 1966.
- Cooper, H.L., Nature 227, 1105, 1970a.
- Cooper, H.L., Proc. 5<sup>th</sup> Leuc. Cult. Conf. (1970b), 15.
- Cooper, P.D., Virology 13, 153, 1961a.
- Cooper, P.D., Adv. Virus Res. 8, 319, 1961b.
- Cooperband, S.R., Green, J.A., Kennedy, M.A., Grant, M.M., Nature 214, 1240, 1967.
- Cooperband, S.R., Bondevik, H., Schmid, K., Mannick, J.A., Science 159, 1243, 1968.
- Copperman, R., Morton, H.E., Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 123, 790, 1966.
- Craddock, C.G., Longmire, R., McMillan, R., New Eng.J.Med. 285, 324, 1971.  
New Eng.J.Med. 285, 378, 1971.
- Crowther, D., Melnick, J.L., Virology 15, 65, 1961.
- Darnell, J.E., Cold Spring Harb. Symp. Quant.Biol. 27, 149, 1962.
- Darżynkiewicz, Z., Bolund, L., Ringertz, N.R., Exp. Cell Res. 55, 120, 1968.
- Darżynkiewicz, Z., Bolund, L., Ringertz, N.R., Exp. Cell Res. 56, 418, 1969.
- Duc Nguyen, H., Henle, W., J.Bact. 92, 258, 1966.
- Dulbecco, R., Vogt, M., J.Exp.Med. 99, 167, 1954.
- Dutton, R.W., Adv. Immunol. 6, 254, 1967.
- Dutton, R.W., McCarthy, M.M., Mishell, R.J., Raidt, D.J., Cell Immunol. 1, 196, 1970.
- Eagle, H., Science, 130, 432, 1959.
- Earle, W.R., Canc.Res. 7, 727, 1947.
- Edelman, R., Wheelock, E.F., J. Virol. 1, 1139, 1967.
- Edelman, R., Wheelock, E.F., J. Virol. 2, 440, 1968.
- Elves, M.W., Wilkinson, J.F., Nature 194, 1257, 1962.
- Elves, M.W., Roath, S., Israëls, M.C.G., Lancet 1, 806, 1963.
- Elves, M.W., Gough, J., Chapman, J.A., Israëls, M.C.G., Lancet 1, 306, 1964.

- Elves, M.W., Gough, J., Israëls, M.C.G., Exp. Cell Res. 44, 624, 1966.
- Elves, M.W., (Ed.) Proc.Symp. "The Biological Effects of Phytohaemagglutinin"  
The Robert Jones and Agnes Hunt Orthop. Hosp. Manag.Comm. Oswestry,  
England (1966a).
- Elves, M.W., "The Lymphocytes" Year Book Med.Publ., Chicago (1966b).
- Epstein, L.B., Cline, M.J., Merigan, T.C., J. Clin. Invest. 50, 744, 1971a.
- Epstein, L.B., Cline, M.J., Merigan, T.C., Cell.Immunol. 2, 602, 1971b.
- Epstein, M.A., Lancet 1, 1344, 1971c.
- Erikson, R.L., Ann. Rev. Biochem. 37, 305, 1968.
- Eustatia, J.M., Proefschrift, 1971.
- Eustatia, J.M., van der Veen, J., Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 137, 424, 1971.
- Fallon, H.J., Burk, D., J.Lab.Clin.Med. 59, 779, 1962.
- Fitzgerald, M.G., Clin.Exp.Immunol. 8, 421, 1971.
- Fitzgerald, M.G., J.Clin.Path. 25, 163, 1972.
- Franklin, R.M., Baltimore, D., Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol. 27,  
175, 1962.
- Freiesleben Sørensen, S., Anderson, V., Giese, J., Act.Path.Microbiol.  
Scand. 76, 259, 1969.
- French, R.C., Armstrong, R.E., Nagler, F.P., Can.J.Microbiol. 5, 461, 1959.
- Friedman, H., Ceglowski, W.S., Proc. 1<sup>st</sup> Int. Congr. Immunol.: (Ed. Amos, B.)  
Acad.Press (N.Y.), (1971), 815.
- Friedman, R.M., Cooper, H.L., Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 125, 901, 1967.
- Fulginiti, V.A., Kempe, C.H., Hathaway, W.E., in "Immunologic Deficiency  
Diseases in Man" (Ed. Bergsma, D.) 4, 129, 1968.
- Furth, R. van, Cohn, Z.A., J.Exp.Med. 128, 415, 1968.
- Furth, R. van, (Ed) "Mononuclear Phagocytes" Blackwell Oxford (1970).
- Gard, S., Rhodes, A.J., Int.Virol. 1, 105, 1969.
- Garvin, J.E., J.Exp.Med. 114, 51, 1961.
- Glasgow, L.A., Arch.Intern.Med. 126, 125, 1970a.
- Glasgow, L.A., J.Gen.Physiol. 56, 212, 1970b.
- Goldberg, M.L., Rosenau, W., Burke, G.C., Moon, H.D., Proc.Soc.Exp.  
Biol.Med. 134, 459, 1970.
- Gönczöl, E., Jeney, E., Gergely, L., Vaczi, L., Zentr.Blatt. für Bakt. und  
Hyg. 210, 289, 1969.
- Goodman, G.T., Koprowski, H., Proc.Nat.Acad.Sci. 48, 160, 1962.
- Gough, J., Elves, M.W., Israëls, M.C.G., Exp. Cell Res. 38, 476, 1965.



- Gowans, J.L., MacGregor, D.P., *Progr.Allergy* 9, 1, 1965.
- Green, J.A., Cooperband, S.R., Kibrick, S., *Science* 164, 1415, 1969.
- Gresser, J., *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 108, 799, 1961.
- Gresser, J., Chany, C., *J.Immunol.* 92, 889, 1964.
- Gresser, J., Lang, D.J., *Progr.Med.Virol.* 8, 62, 1966.
- Hanafin, J.M., Cline, M.J., *J.Cell Biol.* 46, 97, 1970.
- Hand, R., Ensminger, W.D., Tamm, J., *Virology* 44, 527, 1971.
- Hanks, J.H., Wallace, R.E., *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 71, 196, 1949.
- Hargreaves, F.D., Leach, R.H., *J.Med.Microbiol.* 3, 259, 1970.
- Hartog, M., Cline, M.J., Grodsky, G.M., *Clin.Exp.Immunol.* 2, 217, 1967.
- Hayflick, L., Moorhead, P.S., *Exp. Cell Res.* 25, 585, 1961.
- Hayhoe, F.G.J., Flemans, R.J., *Atlas der hämatologischen Zytologie*, Springer Verlag, Berlin (1969).
- Helden, H.P.T. van, *Proefschrift* 1971.
- Hersh, E.M., Oppenheim, J.J., *New Eng.J.Med.* 273, 1006, 1965.
- Hersh, E.M., Harris, J.E., *J.Immunol.* 100, 1184, 1968.
- Hirsch, M.S., Murphy, F.A., *Lancet*, 1, 37, 1968.
- Hirsch, M.S., Zisman, B., Allison, A.C., *J.Immunol.* 104, 1160, 1970.
- Hirschhorn, R., Hirschhorn, K., Weissmann, G., *Blood* 30, 84, 1967.
- Holland, J.J., McLaren, L.C., *J.Exp.Med.* 114, 161, 1961.
- Holland, J.J., Hoyer, B.H., *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 27, 101, 1962.
- Holland, J.J., *Bact.Rev.* 28, 3, 1964.
- Horrocks, D.L., Studier, M.H., *Anal.Chem.* 33, 615, 1961.
- Hotham-Iglewski, B., Ludwig, E.H., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 22, 181, 1966.
- Howes, D.W., Melnick, J.L., *Virology* 4, 97, 1957.
- Howes, D.W., *Virology* 9, 110, 1959.
- Hunt, T., Ehrenfeld, E., *Nature New Biol.* 230, 91, 1971.
- Janossy, G., Greaves, M.F., *Clin.Exp.Immunol.* 9, 483, 1971.
- Jasinska, J., Steffen, J.A., Michalowski, A., *Exp.Cell Res.* 61, 333, 1970.
- Johnson, G.J., Russell, P.S., *Nature* 208, 343, 1965.
- Johnson, R.T., *J.Exp.Med.* 120, 359, 1964.
- Joklik, W.K., *Progr.Med.Virol.* 7, 44, 1965.
- Kantoch, M., Warwick, A., Bang, F.B., *J.Exp.Med.* 117, 781, 1963.
- Kay, J.E., *Nature* 215, 737, 1967.
- Kay, J.E., Leventhal, B.G., Cooper, H.L., *Exp.Cell Res.* 54, 94, 1969.
- Kay, J.E., Ahern, T., Atkins, M., *Biochem.Biophys. Acta* 247, 322, 1971.
- Killander, D., Rigler, R., *Exp. Cell Res.* 39, 701, 1965.
- Killander, D., Rigler, R., *Exp. Cell Res.* 54, 163, 1969.

- Kinard, F. E., *Rev. Sci. Instrum.* 28, 293, 1957.
- Kleinsmith, L. J., Allfrey, V. G., Mirsky, A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 55, 1162, 1966.
- Kovács, E., Baratawidjaja, R. K., Walmsley, A., Labzoffsky, N. A., *Arch. Ges. Virusforsch.* 14, 143, 1963.
- Lamvik, J. O., *Acta Haematol.* 35, 294, 1966.
- Lawrence, H. S., Landy, M. (Eds) "Mediators of Cellular Immunity" Acad. Press. N. Y. (1969).
- Lee, S. H. S., Ozere, R. L., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 118, 190, 1965.
- Leibowitz, R., Penman, S., *J. Virol.* 8, 661, 1971.
- Levis, W. R., Robbins, J. H., *Exp. Cell Res.* 61, 153, 1970.
- Li, J. G., Osgood, E. E., *Blood* 4, 670, 1949.
- Lindahl-Kiessling, K., *Exp. Cell Res.* 70, 17, 1972.
- Ling, N. R., Holt, P. J., *J. Cell Sci.* 2, 57, 1967.
- Ling, N. R., "Lymphocyte Stimulation", N. H. Publ. Cy. Amsterdam (1968).
- Lockart, R. Z., *Progr. Med. Virol.* 9, 451, 1967.
- Lorenz, R. J., *Arch. Ges. Virusforsch.* 12, 108, 1962.
- MacFarland, W., *Proc. 3<sup>rd</sup> Leuc. Cult. Conf.* (1969), 77.
- MacKanness, G. B., Blanden, R. V., *Progr. Allergy* 11, 89, 1967.
- MacKanness, G. B., *Sem. Haematol.* 7, 172, 1970.
- Mandel, B., *Virology* 31, 702, 1967.
- Martin, E. M., Kerr, J. M., in "Molecular Biology of Viruses" 18<sup>th</sup> Symp. of Soc. Gen. Microbiol., Univ. Press Cambridge (1968).
- Mauch, J., Defendi, V., *J. Expt. Med.* 134, 335, 1971.
- McIntyre, O. R., Cole, A. F., *Int. Arch. Allergy* 35, 105, 1969.
- Mella, B., Lang, D. J., *Science* 155, 80, 1967.
- Mellman, W. J., Plotkin, A. S., Moorhead, P. S., Hartnett, E. M., *Am. J. Dis. Child* 110, 473, 1965.
- Melnick, J. L., Crowther, D., Barrera-Oro, J., *Science* 134, 556, 1961.
- Merigan, T. C., in "In vitro Methods in Cell-Mediated Immunity" (Eds. Bloom, B., Glade, P.) Acad. Press. N. Y. (1971).
- Michalowski, A., *Exp. Cell Res.* 41, 669, 1966.
- Miller, G., Enders, J. F., *J. Virol.* 2, 787, 1968.
- Miller, J. F. A. P., Basten, A., Sprent, J., Cheers, C., *Cell Immunol.* 2, 469, 1971.
- Milstone, L. M., Waksman, B. H., *J. Immunol.* 105, 1068, 1970.
- Mims, C. A., *Bact. Rev.* 28, 30, 1964.
- Mitchell, G. F., Mishel, R. J., Herzenberg, L. A., in "Proc. 1<sup>st</sup> Int. Congr. Immunol." (Ed. Amos, B.) Acad. Press. N. Y. (1971). 324.

- Möller, G., Immunology 19, 583, 1970.
- Möller, G., Immunology 22, 441, 1972.
- Montgomery, J.R., South, M.A., Rawls, W.E., Melnick, J.L., Olson, G.B.,  
Dent, P.B., Good, R.A., Science 157, 1068, 1967.
- Moorhead, J.F., McFarland, W.W., Nature 211, 1157, 1966.
- Moorhead, J.F., Conolly, J.J., McFarland, W.W., J.Immunol. 99, 413, 1967.
- Morgan, J.F., Morton, H.J., Parker, R.C., Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 73, 1  
1950.
- Mosier, D.E., J.Exp.Med. 129, 351, 1969.
- Nahmias, A.J., Kibrick, S., Rosan, R.C., J.Immunol. 93, 69, 1964.
- Naspitz, C.K., Richter, M., Progr. Allergy 12, 1, 1968.
- Nelson, D.S., "Macrophage and Immunity", N.H. Publ.Cv. Amsterdam (1969).
- Nelson, E., Hager, H., Kovács, E., Science 139, 449, 1963.
- Notkins, A.L., Mergenhagen, S.E., Howard, R.J., Ann.Rev.Microbiol. 24,  
525, 1970.
- Nowell, P.C., Canc.Res. 20, 462, 1960.
- Oettgen, H.F., Silber, R., Miescher, P.A., Hirschhorn, K., Clin.Exp.  
Immunol. 1, 77, 1966.
- Oppenheim, J.J., Leventhal, B.G., Hersh, E.M., J.Immunol. 101, 262, 1968.
- Olson, G.B., Dent, P.B., Rawls, W.E., South, M.A., Montgomery, J.R.,  
Melnick, J.L., Good, R.A., J.Exp.Med. 128, 47, 1968.
- Packard, L.E., in "Liquid Scintillation Counting" (Eds. Bell, C.G., Hayes, F.N.)  
Pergamon Press, London (1958), 50.
- Painter, R.B., Drew, R.M., Hughes, W.L., Science 127, 1244, 1958.
- Parenti, F., Franceschini, P., Forti, G., Cepellini, R., Biochem.Biophys.  
Acta 123, 181, 1966.
- Pastan, I., Perlman, R.L., Nature New Biol. 229, 5, 1971.
- Pearmain, G.E., Lycette, R.R., Fitzgerald, P.H., Lancet 1, 637, 1963.
- Pearsall, N.N., Weiser, Y., "The Macrophage", Lea and Febiger, Philadelphia,  
(1970).
- Penman, S., Becker, Y., Darnell, J.E., J.Mol.Biol. 8, 541, 1963.
- Perez, A.G., Kim, J.H., Gelbard, A.S., Djordjevic, B., Exp. Cell Res. 70,  
301, 1972.
- Pierce, C.W., J.Exp.Med. 130, 365, 1969.

- Pogo, B.G.T., Allfrey, V.G., Mirsky, A.E., *Proc.Nat.Acad.Sci.* 55, 805, 1966.
- Powers, C.D., Miller, B.A., Kurtz, H., Ackermann, W.W., *J.Virol.* 3, 337, 1969.
- Quaglino, D., Hayhoe, F.G.J., Flemans, R.J., *Nature* 196, 338, 1962.
- Quastel, M.R., Kaplan, J.G., *Exp.Cell Res.* 62, 407, 1970.
- Rabinowitz, Y., *Blood* 23, 811, 1964.
- Rabinowitz, Y., Schimo, I., Wilhite, B.A., *Brit.J.Haemat.* 15, 455, 1968.
- Rawls, W.E., *Progr.Med.Virol.* 10, 238, 1968.
- Richter, M., Naspitz, C.K., *Int.Arch. Allergy* 32, 288, 1967.
- Robbins, J.H., *Science* 146, 1648, 1964.
- Roberts, J.A., *J.Immunol.* 92, 837, 1964.
- Roos, D., Loos, J.A., *Biochem.Biophys. Acta* 222, 565, 1970.
- Rubin, A.D., Cooper, H.L., *Proc.Nat.Acad.Sci.* 54, 469, 1965.
- Rubin, A.D., *Blood* 35, 708, 1970.
- Rubin, H., *Proc. 5<sup>th</sup> Leuc.Cult.Conf.* (1970b), 239.
- Salzman, N.P., Pellegrino, M., Franceschini, P., *Exp. Cell Res.* 44, 73, 1966.
- Sample, W.F., Chretien, P.B., *Clin.Exp.Immunol.* 9, 419, 1971.
- Savel, H., Philips, C.A., *Microbiol.* 5, 49, 1970.
- Schellekens, P.T.A., Eysvogel, V.P., *Clin.Exp.Immunol.* 3, 571, 1968.
- Schwartz, J., *Ann.Rev.Med.* 19, 269, 1968.
- Schwartz, R.S., Ryder, R.J.W., Gottlieb, A.A., *Progr.Allergy* 14, 81, 1970.
- Seeger, R.C., Oppenheim, J.J., *J.Exp.Med.* 132, 44, 1970.
- Shortmann, K., Williams, N., Jackson, H., Russell, P., Byrt, P., Diener, F.J., *J.Cell Biol.* 48, 566, 1971.
- Simberkoff, M.S., Thorbecke, G.J., Thomas, L., *J.Exp.Med.* 129, 1163, 1969.
- Simmons, M.F., Fowler, R., Fitzgerald, M.G., *Cell Tissue Kinet.* 2, 1, 1969.
- Silverstein, S., *Sem. Haemat.* 7, 185, 1970.
- Skoog, W.A., Beck, W.S., *Blood* 11, 436, 1956.
- Smith, R.T., Bausher, J.A.C., Adler, W.H., *Ann.J.Path.* 60, 495, 1970.
- Sokol, F., Cox, D.C., Dinka, S., Ackermann, W.W., *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 119, 1015, 1965.
- Sommerville, R.G., McFarland, P.S., *Lancet* 1, 911, 1964.
- Spector, W.G., in "Mononuclear Phagocytes" (Ed. Furth, R. van) Blackwell, Oxford (1970), 219.
- Stuart, A.E., "The Reticulo Endothelial System", Livingstone, Edinburgh, 1970.

- Taylor, J., Graham, A.F., Virology 13, 427, 1961.
- Tompkins, W.A.F., Zarling, J.M., Rawls, W.E., Inf. and Imm. 2, 783, 1970.
- Torelli, K., Quaglino, D., Artusi, T., Emilia, G., Ferrari, G., Mauri, C.,  
Exp. Cell Res. 42, 1, 1966.
- Tormey, D.C., Mueller, G.C., Blood 26, 569, 1965.
- Unanue, E.R., Cerotini, J.C., Nature 222, 1193, 1969.
- Unanue, E.R., Cerotini, J.C., Sem. Haemat. 7, 225, 1970.
- Valle, M., Arch.Path.Microbiol.Scand. Sect. B. Suppl. 219, 1971.
- Verlinde, J.D., Wilterdink, J.B., Arch.ges.Virusforsch. 32, 311, 1970.
- Vernon-Roberts, B., "The Macrophage", Univ. Press, Cambridge (1972).
- Volkert, M., Hannover-Larsen, J., Progr.Med.Virol. 7, 160, 1965.
- Wachter, R. de, Fiers, W., Arch.Int.Physiol.Biochem. 74, 915, 1966.
- Wallace, R.E., Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 130, 702, 1969.
- Weber, W.T., Immunology 15, 173, 1968.
- Wheelock, E.F., Science 149, 310, 1965.
- Wheelock, E.F., J.Bact. 92, 1415, 1966.
- Wheelock, E.F., Edelman, R., J.Immunol. 103, 429, 1969.
- Wheelock, E.F., in "Proc. 1<sup>st</sup> Int.Congr. of Immunol." (Ed. Amos, B.), Acad.  
Press, N.Y. (1971).
- Wildy, P., Ridley, M., Nature 182, 1801, 1958.
- Willems, F.Th.C., Melnick, J.L., Rawls, W.E., Proc.Soc.Exp.Biol.Med.  
130, 652, 1969a.
- Willems, F.Th.C., Melnick, J.L., Rawls, W.E., J.Virol. 3, 451, 1969b.
- Willems, F.Th.C., Rawls, W.E., Arch.ges.Virusforsch. 27, 352, 1969c.
- Willems, F.Th.C., Vondrovicova, E.L., Arch.ges.Virusforsch. 30, 31, 1970.
- Wilson, D.B., J.Expt.Zool. 162, 161, 1966.
- Yamamoto, H., Nature 212, 997, 1966.
- Yanamura, Y., Kawatika, Y., Rinsho, N., Jap.J.Clin.Med. 21, 1201, 1963.
- Yoffey, J.N., Winter, G.C.B., Osmond, D.G., Meek, E.S., Brit.J.Haematol.  
11, 488, 1965.
- Younger, J.S., J.Immunol. 76, 288, 1956.
- Zisman, B., Wheelock, E.F., Allison, A.C., J.Immunol. 107, 236, 1971.
- Zweiman, B., J.Immunol. 106, 1154, 1971.

## STELLINGEN

1. Het moeten verdedigen van stellingen is een anachronisme.
2. De hypothese dat histonen een rol zouden spelen in de regulatie der gen-aktiviteit lijkt onwaarschijnlijk.
3. Het effectief funktionieren van de V.N. wordt bemoeilijkt door artikel 2 van het Handvest.
4. Door socialisatie van ons ekonomisch stelsel alleen, is de wezenlijke krisis ervan niet op te lossen.
5. De ontwikkeling der techniek vormt geen bedreiging voor de democratie, ze verschaft hiertoe juist de mogelijkheid.
6. Toepassing van het profijtbeginsel op onderwijsvoorzieningen is een onjuist getrokken konklusie uit juist gestelde premissen.
7. De genoten studie op kosten van de gemeenschap biedt voldoende grond om de te hoge honoraria van medische specialisten te verminderen.
8. De W. U. B. geeft autoritair gezinde hoogleraren voldoende mogelijkheden hun macht onaangetast te laten.
9. Van iedere industriële gebruiker van rivierwater moet worden geeist dat hij zijn toevoerkanaal stroomafwaarts van zijn afvoerkanaal plaatst.
10. De Verenigde Staten van Amerika maken zich in Indo-China schuldig aan oorlogsmisdaden volgens normen van internationaal recht.

19 januari 1973

F. Soontjens



